

# INAUGURAL – DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen - Mathematischen Gesamtfakultät  
der Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
**Diplom-Biologe Florian Kurschus**  
aus Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# **Der Einfluß eines fötal exprimierten Autoantigens auf die Induktion von Autoimmunität während der Schwangerschaft**

Gutachter: Prof. Dr. Günter J. Hämmerling  
Prof. Dr. Friedlinde Bautz

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die Arbeit eigenhändig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 20. März 2001

Florian Kurschus

## Danksagung

Als erstes danke ich meiner Frau Jeanette und meinen Kindern Jonas und Nora für ihre Unterstützung, für viele Wochenenden, die sie in den letzten Monaten ohne mich verbringen mußten, und für ihre Bereitschaft trotz wenig Geld und Zeit die letzten drei Jahre mit mir zu verbringen. Meiner Mutter möchte ich für die Bereitstellung des PC's danken, ohne den ich meine Doktorarbeit im Trubel des Labors hätte schreiben müssen.

Den Menschen, die (außer mir) sicherlich am meisten Arbeit mit meinem Projekt hatten, den Tierpflegerinnen möchte ich ganz herzlich danken, dies waren vor allem: Angelika Frenznik, Sonja Banko, Silke Nord und Claudia Lay. Sabine Schmitt muß ich danken für das Herstellen der transgenen Mäuse und für viele kleine Überraschungen an Geburtstagen und Weihnachten und für die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft in allen Labor-Lebenslagen.

Torsten Sacher möchte ich für die Einführung in das Labor, für viele Laborprotokolle und für das geduldige Diskutieren mancher Fragestellungen und Ergebnisse danken. Anna Tafuri hat mich mit der Literatur zur Immunologie der Schwangerschaft vertraut gemacht und in viele Techniken der Mausearbeit eingelernt. Birgit Liliensiek danke ich für die Möglichkeit einige EAE-Experimente gemeinsam durchzuführen, und dadurch manche Wochenenden nicht zu den Mäusen gehen zu müssen. Günter Küblbeck zeigte mir einige Techniken des Labors wie z.B. den Southern-Blot und die Elektroelution und hat viele Tail-DNA's für mich isoliert. Ebenso danke ich Esmail Rezavandy, der mir unzählige Tail-DNA's präpariert und viele Tail-PCR's für mich durchgeführt hat. Gorana Hollmann muß ich danken für die Präparation der RNA und die Herstellung der cDNA für die hier präsentierten Ergebnisse. Insbesondere Sanela Paljevic, und auch Carmen Henrich muß ich für das häufige Bluten und Herstellen von PBL's zu testender Mäuse danken. Alexandra Klevenz möchte ich für Hilfe und Beratung mit Antikörpern und der Zellkultur danken. Natalio Garcia Garbi möchte ich herzlich dafür danken, daß er sich die Zeit genommen hat, mir die Präparation von Knochenmarkszellen und die Kultivierung von BM-DC's zu zeigen. Anne Forde möchte ich für Hilfe mit der statistischen Auswertung danken. Gerd Moldenhauer, Ruth Ganß und Pascale Brocke sowie Anne Vogt und Harald Kropshofer möchte ich für Beratung und die Bereitstellung von Reagentien danken.

Günter Hämmerling möchte ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, für die Hilfe beim Besorgen wichtiger Reagentien wie Zelllinien und Mäuse, sowie für das offene und wissenschaftlich sehr interessante Klima in der Arbeitsgruppe danken.

Bernd Arnold als meinen direkten Betreuer möchte ich dafür danken, daß ich meine Doktorarbeit in dieser Arbeitsgruppe durchführen konnte. Durch seine Hilfe konnte ich mein Projekt nach gemeinsamer Planung selbständig und frei durchführen und hatte dank seiner erfolgreichen Bemühungen um Drittmittel phantastische Arbeitsmöglichkeiten ohne je an finanzielle Grenzen zu stoßen.

Der gesamten Arbeitsgruppe, sowie dem gesamten 7. Stock möchte ich für die sehr offene und wissenschaftlich wie persönlich interessante Atmosphäre während meiner Doktorarbeit danken.

**Zeitraum für die Erstellung der Dissertation :  
01.09.1997 – 20.03.2001**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem .....	1
1.1.2 Der MHC .....	2
1.1.3 T-Zell Reifung .....	5
1.1.4 Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen .....	7
1.2 Toleranz von T-Zellen .....	9
1.2.1 Zentrale Toleranz: Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus .....	9
1.2.2 Periphere Toleranz .....	10
1.3 Autoimmunität .....	13
1.4 EAE: Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis .....	15
1.4.1 EAE als Model für Multiple Sklerose .....	15
1.4.2 Transgene Mausmodelle für EAE .....	18
1.4.3 Toleranzinduktion in EAE .....	19
1.5 Schwangerschaft und das Immunsystem .....	22
1.5.1 Das Paradoxon: Ein immunologischer Fremdkörper wird nicht abgestoßen .....	22
1.5.2 Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft .....	25
1.5.3 Autoimmunität in der Schwangerschaft .....	27
<b>2. Fragestellung .....</b>	<b>30</b>
<b>3. Material .....</b>	<b>32</b>
3.1 Bezugsquellen .....	32
3.2 Verwendete Kits .....	32
3.3 Geräte .....	32
3.4 Puffer, Lösungen und Reagentien .....	33
3.5 Medien .....	35
3.6 Plasmide .....	36
3.7 Bakterienstämme .....	37
3.8 Zell-Linien .....	37
3.9 Mauslinien .....	37
3.10 Antikörper .....	38
3.11 PCR-Primer .....	38
3.12 Peptide .....	39
<b>4. Methoden .....</b>	<b>40</b>
4.1 Molekularbiologie .....	40
4.1.1 Lagerung von Bakterien .....	40
4.1.2 Präparation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter E. coli Zellen .....	40

4.1.3	Transformation von kompetenten E. coli Zellen mit Plasmid DNA .....	40
4.1.4	DNA-Minipräparation (alkalische Lyse) .....	41
4.1.5	DNA-Maxipräparation (alkalische Lyse) .....	41
4.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	42
4.1.7	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	42
4.1.8	DNA-Präzipitation .....	43
4.1.9	Restriktionsverdau .....	43
4.1.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	43
4.1.11	Ligation von DNA-Enden .....	44
4.1.12	Dephosphorylierung von DNA-Enden .....	44
4.1.13	Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA .....	44
4.1.14	Isolierung von Schwanz-DNA .....	45
4.1.15	Southern-Blot .....	45
4.1.16	PCR .....	46
4.1.17	RT-PCR .....	47
4.1.18	Programme und Produktgrößen für PCR und RT-PCR .....	48
4.2	Herstellung transgener Mäuse .....	50
4.2.1	Aufbau einer Mikroinjektionsanlage .....	50
4.2.2	Herstellung von Injektions- und Haltenadeln .....	50
4.2.3	Präparation von Zygoten aus trächtigen Mäusen .....	50
4.2.4	Mikroinjektion der DNA-Konstrukte .....	50
4.2.5	Zygotentransfer in scheinschwangere Ammenmäuse .....	51
4.3	Antikörper .....	51
4.3.1	Herstellung von Antikörper-Kulturüberständen .....	51
4.3.2	Aufreinigung von Antikörperüberständen .....	51
4.3.3	Biotinylierung von Antikörpern .....	52
4.3.4	FITC-Kopplung von Antikörpern .....	52
4.4	Zellen .....	52
4.4.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	52
4.4.2	Aufreinigung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) .....	52
4.4.3	Einzelzellsuspensionen aus Milz oder Lymphknoten .....	53
4.4.4	Depletion von B-Zellen aus Einzelzellsuspensionen .....	53
4.4.5	Depletion von Zell-Subpopulationen mit Dynabeads .....	53
4.4.6	Proliferationsexperimente .....	53
4.4.7	Gewinnung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkszellen .....	54
4.4.8	Markierung von TCR.Tg4-Zellen mit CFSE .....	54
4.5	Durchflußzytometrie .....	55
4.6	EAE-Induktion .....	55

<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
5.1 Transgene Mäuse zur dominanten Präsentation eines Autoantigens .....	57
5.1.1 Herstellung der DNA-Konstrukte für transgene Mäuse .....	57
5.1.2 N-terminal veränderte MBP-Peptide binden an I-A <sup>u</sup> .....	63
5.1.3 Transgene Founder-Linien .....	63
5.1.4 Selektion der transgenen Founder .....	65
5.2 Charakterisierung der selektionierten transgenen Linien .....	70
5.2.1 Expression .....	70
5.2.2 Auswirkungen der Transgenexpression auf das T-Zellrepertoire .....	75
5.2.3 Funktionelle Expression der Transgene in der Peripherie .....	92
5.3 Einfluß der fötalen Expression des Transgenes auf die Induktion von EAE während der Schwangerschaft .....	97
5.3.1 Transgen-Expression in Plazenta und Fötus .....	97
5.3.2 Vorexperimente .....	97
5.3.3 EAE-Induktion in der Schwangerschaft mit transgenen Männchen .....	100
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>105</b>
6.1 Strategie .....	105
6.2 Founder-Linien .....	106
6.3 Expression, Gewebeverteilung und Einfluß der Invarianten Kette .....	108
6.4 Auswirkungen der Transgenexpression auf das T-Zellrepertoire .....	110
6.5 Funktionelle Expression in der Peripherie .....	117
6.6 Schwangerschaftsexperimente .....	120
6.7 Mögliche zukünftige Schwangerschaftsexperimente mit den transgenen Linien .....	124
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>125</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>127</b>
<b>9. Abkürzungen .....</b>	<b>144</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Wirtes vor Infektionen durch pathogene Organismen. Diese pathogenen Organismen können so extrem diversen Lebensformen angehören wie den Viren, Prokaryonten, sowie einzelligen und mehrzelligen Eukaryonten. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, hat sich das Immunsystem der höheren Vertebraten zu einem System sehr hoher Komplexität entwickelt. Das Immunsystem ist nicht in einem Organ lokalisiert. Es ist sowohl in unterschiedlichen Einheiten (Milz, Lymphknoten, GALT (engl.: Gut Associated Lymphoid Tissue), Lymphbahnen, Blut, Knochenmark und Thymus), als auch in allen Organen und Geweben verteilt. Dies ermöglicht zum einen die sofortige Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen an jedem Ort, und zum anderen die effektive Reifung und Verstärkung von spezifischen Effektormechanismen. Das Immunsystem wird in zentrale (Knochenmark und Thymus) und in periphere Bereiche (Lymphknoten, Milz, GALT und nicht fest lokalisierte Bestandteile) eingeteilt. In den zentralen Bereichen findet die Generierung und Reifung der Immunzellen statt. In den peripheren Bereichen werden spezifische Effektormechanismen generiert. Diese potenzieren die Bekämpfung der Pathogene am Ort der Infektion.

Die komplizierten und unterschiedlichen Aufgaben des Immunsystems machen die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd, die immunologische *Toleranz*, zu einem zentralen Thema in der Immunologie. Fehler in der Toleranz gegen Selbst führen zur Autoimmunität, während die Erkennung von Fremd in der artifiziellen Situation der Transplantation zur Abstoßung von nicht pathogenem Gewebe führt.

### 1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Das Immunsystem höherer Vertebraten läßt sich in zwei miteinander wechselwirkende Systeme einteilen. Das *angeborene Immunsystem*, besteht aus den entwicklungsgeschichtlich ursprünglicheren Zelltypen und Effektormechanismen. Dazu zählen Monozyten / Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen, Mastzellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Humorale, also nicht-zelluläre Bestandteile sind das Komplementsystem, Akutphaseproteine, sowie das Mannose bindende Lektin MBL. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen invariante Bestandteile von Pathogenen, also Fremdstrukturen mittels sogenannter PRR's (engl.: Pattern Recognition Receptor). Es werden Moleküle von Pathogenen wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Mannose auf der Bakterien-Zellwand, sowie doppelsträngige virale RNA erkannt. Die Erkennung dieser Moleküle führt zur sofortigen Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Das angeborene Immunsystem muß daher weder die Fremderkennung lernen, noch kann es ein sogenanntes Gedächtnis (Memory) ausbilden. Die Zellen des angeborenen Immunsystems stellen die erste Front der Immunabwehr dar, die sofort bei dem Eintritt eines Pathogens aktiv wird.

Eine anhaltende Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt, in Gegenwart von Antigenen, zur Aktivierung des *adaptiven Immunsystems*. Dazu zählen die B- und T-Zellen so-



wie die, von B-Zellen sezernierten, Antikörper. Hierbei werden B- und T-Zellen, die einen für ein Antigen eines Pathogens *spezifischen* Rezeptor haben, selektiv expandiert (*klonale Selektion* (Burnet, 1959)) und differenzieren in unterschiedliche Effektorzelltypen. Im Gegensatz zu den Rezeptoren der Zellen des angeborenen Immunsystems werden diese Rezeptoren aus der zufälligen Kombination (*somatische Rekombination*) verschiedener polygener Unter-einheiten gebildet und erkennen daher potentiell alle molekularen Strukturen. Aus diesem Grund müssen B- und T-Zellen die Toleranz für eigene Strukturen "*erlernen*". Während einer Immunantwort differenzieren einige der spezifisch aktivierten Zellen zu Gedächtniszellen. Diese bilden das sogenannte *Memory*, das bei einer Zweitinfektion mit demselben Pathogen zu einer schnelleren Immunantwort führt. Kennzeichnend für das adaptive Immunsystem sind somit die Spezifität und damit verbunden die hohe Anpassungsfähigkeit an die verschiedensten Antigene (*Diversität*), sowie die Bildung des immunologischen Gedächtnisses.

Das adaptive Immunsystem beruht auf der Bildung der hochvarianten Antigen-Rezeptoren von B- und T-Zellen. B-Zellen reifen im Knochenmark heran und exprimieren den B-Zellrezeptor (BCR). Der B-Zellrezeptor enthält zwei gleiche Antigenerkennungsstellen und erkennt Antigene als native, komplexe Epitope. Nach Aktivierung der jeweiligen B-Zelle wird dieser B-Zellrezeptor als lösliches Molekül, als Antikörper sekretiert. T-Zellen reifen im Thymus und exprimieren den antigenspezifischen T-Zellrezeptor (TCR). Im Gegensatz zum BCR hat der TCR nur eine Antigenbindungsstelle und erkennt Antigene als Peptide im Komplex mit körpereigenen Major Histocompatibility (*MHC*)-Molekülen. Während der BCR eine sehr hohe Affinität zum Antigen haben kann ( $K_d$   $10^{-7}$ - $10^{-11}$  M), liegt die Affinität vom TCR zum MHC-Peptidkomplex bei nur  $10^{-5}$  bis  $10^{-7}$  M. Die hohe Diversität, die kennzeichnend für die adaptive Immunantwort ist, beruht auf theoretisch  $10^{11}$  und  $10^{16}$  unterschiedlichen BCR's bzw. TCR's ( $\alpha\beta$ ) (Davis und Bjorkman, 1988; Tonegawa, 1983).

Ein Zelltyp, der die zentrale Rolle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem einnimmt, sind die Dendritischen Zellen. Dendritische Zellen werden am Ort der Infektion aktiviert, nehmen Antigene auf, wandern zu lokalen Lymphknoten und aktivieren dort wiederum antigenspezifische Lymphozyten (Banchereau et al., 2000). Sie sind somit die Vermittler zwischen beiden Zweigen des Immunsystems.

Beide Typen des Immunsystems haben Wechselwirkungen aufeinander und komplementieren sich gegenseitig.

### 1.1.2 Der MHC

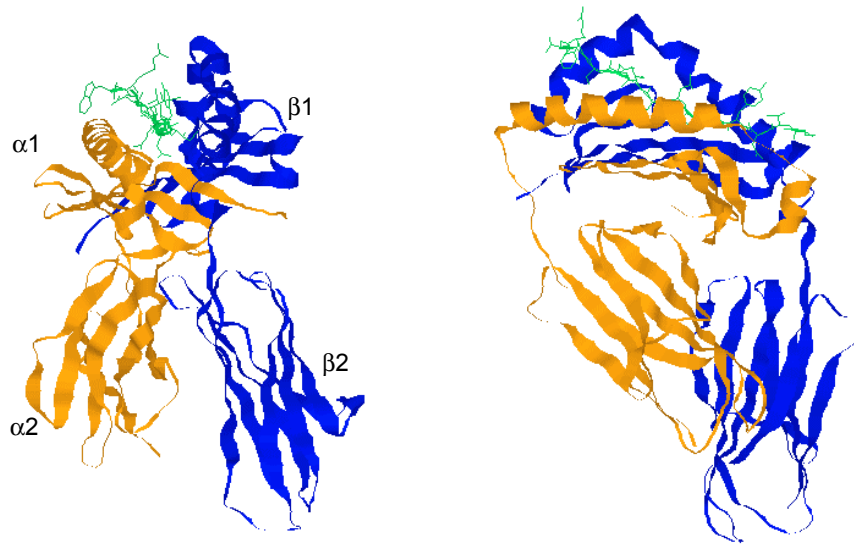
Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: Major Histocompatibility complex; MHC) ist ein großer Genkomplex, der beim Menschen auf Chromosom 6 und bei der Maus auf Chromosom 17 liegt. Bei der Maus umfaßt er etwa 2000 kb mit mehr als 120 Genen (Allcock et al., 2000). Der MHC wurde aufgrund seiner Fähigkeit entdeckt, in Inzuchtmäusen die Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen zu vermitteln (Snell, 1948). Die Gene des MHC werden in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Während MHC Klasse I und Klasse II Gene für die typischen Gewebeverträglichkeitsproteine, auch MHC-Moleküle genannt, kodieren, liegen im MHC Klasse III Locus andere, meist immunrelevante Gene wie z.B. Gene für die Komplementfaktoren C4 und C2, NOTCH4, RAGE und  $TNF\alpha$  und  $\beta$ . Die MHC Klasse I Region kodiert für die  $\alpha$ -Ketten klassischer und nicht klassischer MHC Klasse I-Moleküle (MHC I). Alle

MHC I  $\alpha$ -Ketten bilden Heterodimere mit dem nichtpolymorphen  $\beta$ 2-Mikroglobulin, das auf einem anderen Chromosom kodiert wird. Klassische MHC-Moleküle sind die Moleküle, die Peptide für  $\alpha\beta$ -T-Zellen präsentieren. Beim Menschen gibt es drei klassische MHC I: HLA-A, -B und -C (Humane Leukozyten Antigene). Die drei klassischen MHC I-Moleküle der Maus werden H-2K, H-2D und H-2L genannt. Alle klassischen MHC-Moleküle sind hochpolymorph. Für Maus-MHC wurden die verschiedenen Allele nach dem Haplotyp der ersten Inzuchtlinien benannt, mit denen diese Allele serologisch definiert wurden. Da die Haplotypen mit H-2<sup>a</sup>, H-2<sup>b</sup> usw. benannt wurden, heißen die verschiedenen Allele eines MHC I Moleküls H-2K<sup>b</sup>, H-2D<sup>k</sup> etc. oder abgekürzt nur K<sup>b</sup> oder D<sup>k</sup>. MHC Klasse II (MHC II)-Moleküle sind Heterodimere aus polymorphen  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten, die beide im MHC Klasse II kodiert sind. Beim Menschen gibt es drei Loci für klassische MHC Klasse II Moleküle, HLA-DR, -DP, -DQ und bei der Maus zwei: I-A und I-E.

MHC I ist ubiquitär auf fast allen Zellen exprimiert. Die Peptidbindungsgrube des MHC I-Moleküls ist an den Enden stark verengt. Daher binden die MHC I-Moleküle präferentiell kurze Peptide von 8-10 AS. Diese stammen vor allem aus intrazellulär synthetisierten, zytosolischen Proteinen. Diese Peptide werden durch das Proteasom generiert und über TAP (transporter associated with antigen processing) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort erfolgt mit Hilfe mehrerer Chaperone (ER60, Tapasin, Calretikulin, Calnexin) das "Assembly" des tertiären MHC-Peptid Komplexes. Peptide binden an MHC I sowohl über Wasserstoffbrücken des Peptid-Rückgrats zum MHC, als auch mit der Aminogruppe des N- und der Carboxylgruppe des C-Terminus in der sogenannten A- bzw. F-Tasche des MHC I (Urban et al., 1993). Die MHC I-Peptid Komplexe werden auf der Zelloberfläche CD8-positiven T-Zellen präsentiert.

MHC II wird im Gegensatz zu MHC I nur von antigenpräsentierenden Zellen (APC's; B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen) und einigen wenigen spezialisierten Zelltypen, wie z.B. Thymusepithel, verschiedenen anderen Epithelien wie Darmepithel und in manchen Endothelien sowie im Menschen auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Zudem kann es auf vielen Zelltypen während einer Entzündung durch die Wirkung von IFN- $\gamma$  induziert werden (Benoist und Mathis, 1990). Die Peptide, die an MHC II binden haben eine variabelere Länge (durchschnittlich 13-23 AS, (Urban et al., 1993)), da sie am N- und C-Terminus aus der Peptidbindungsgrube herausragen können (Abb. 1.1).

Die gebundenen Peptide haben eine ausgestreckte Typ II Polyprolin-Konformation. Die Bindung der Peptide an das MHC II Molekül erfolgt durch Wasserstoffbrücken konservierter Asparaginreste der  $\alpha$ -Helices der Bindungsgrube zu Carbonyl- und Amidgruppen des Peptid-Rückgrates, also Sequenz-unabhängig (Abb. 1.1). Zudem gibt es spezielle Ankerreste des Peptides und dazu passende Taschen im MHC II, welche die Affinität des Peptides zum MHC II Molekül entscheidend beeinflussen können (Stern et al., 1994). Wenn z. B. ein großer polarer Rest in eine hydrophobe Tasche ragt, so hat das Peptid eine geringere Affinität, als das analoge Peptid mit einer entsprechend hydrophoben Seitenkette. Die Bindung von Peptiden stabilisiert die heterodimeren MHC-Moleküle. Es kommen zwar auch leere MHC II-Moleküle zur Zelloberfläche, diese haben jedoch eine kürzere Halbwertszeit und sind nicht stabil in SDS bei 25°C. Deswegen wird die Stabilität der MHC-Moleküle auch als Maß dafür genommen wie gut stabil bindende Peptide in der APC selektiert wurden (Cresswell, 1994).



**Abb. 1.1: Das MHC-Klasse II Molekül I-A<sup>k</sup> mit dem Peptid HEL<sub>50-62</sub>.** Kristallstruktur von I-A<sup>k</sup> mit einer Auflösung von 1,9 Å, Nach (Fremont et al., 1998); mit dem Programm RasMol Version 2.6 bearbeitet in zwei Ansichten. Orange: I-A<sup>k</sup>-α; Blau: I-A<sup>k</sup>-β; Grün: HEL-Peptid 50-62. α und β als Ribbon, das Peptid mit Seitenketten als Wireframe. Das Peptid ist über einen Gycin-Serin Linker an die β-Kette von I-A<sup>k</sup> gebunden und liegt in der Peptidbindungsgrube von I-A<sup>k</sup>. Der Linker ist jedoch durch die hohe Flexibilität nicht auflösbar, und daher nicht abgebildet. Beide Ketten wurden anstelle einer Transmembranregion mit einem GPI-Anker versehen und für die Aufreinigung enzymatisch davon abgespalten. Die Domänen sind in der linken Abbildung mit α1/α2 bzw. β1/β2 gekennzeichnet. Peptidsequenz HEL<sub>50-62</sub>: **STDYILQINSRW**. Ankerreste fett gedruckt: D=P1; I=P2; Q=P6; S=P9.

MHC-Moleküle binden eine Vielzahl verschiedener Peptide. Für jedes einzelne MHC-Allel lässt sich jedoch ein sogenanntes spezifisches Peptid-Motiv charakterisieren. Diese Motive sind ähnlich einer Konsensussequenz, beziehen sich jedoch vor allem auf die Peptid-Ankerreste (Rammensee et al., 1995). Die Kristallstruktur von I-A<sup>k</sup> in Abb. 1.1 zeigt deutlich, daß einige Reste in die Peptidbindungsgrube hineinragen. Diese bilden die Anker-Reste des Peptides. Andere Reste ragen aus dem Peptid-MHC-Komplex heraus. Diese Reste verstärken die leichte Bindung von antigenspezifischen TCR's an das MHC-Molekül und führen damit zur Aktivierung der T-Zelle, die diesen Rezeptor exprimiert.

Die Peptide, die an MHC II binden, stammen größtenteils von exogenen extrazellulären, sekretierten oder membranständigen Proteinen. Die Peptidbeladung erfolgt nicht im ER, sondern in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten. Damit die neusynthetisierten MHC II Moleküle nicht direkt im ER beladen werden, binden diese im ER an das **Invariante Kette** (Ii)- Trimer, formen dadurch einen nonameren Komplex und werden durch ein Sortierungssignal im zytoplasmatischen Teil von Ii durch das Golgi-Netzwerk zu endosomalen/lysosomalen Kompartimenten geleitet. Die Bindung an Ii erfolgt über eine interne Region in Ii, die CLIP (engl.: class II associated Ii chain peptide) genannt wird. CLIP bindet direkt in die Peptidbindungsgrube des MHC II und inhibiert dadurch die Bindung anderer Peptide (Cresswell, 1996). Im Endosom oder frühen Lysosom wird Ii von Proteasen degradiert und CLIP mit Hilfe des nicht klassischen MHC II Moleküls DM gegen Peptide mit höherer Affinität zu MHC II ausgetauscht (Vogt et al., 1997). Die mit Peptid beladenen MHC II Moleküle ge-

langen von dort auf die Zelloberfläche und präsentieren das gebundene Peptid CD4-positiven T-Zellen.

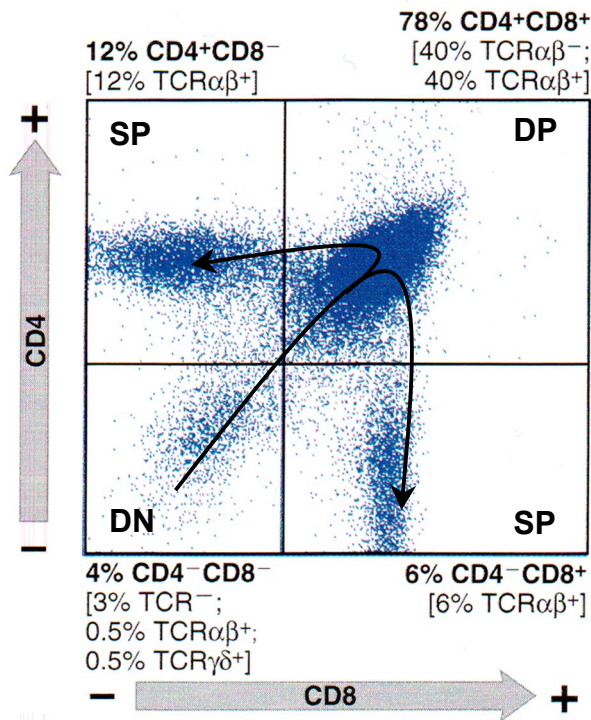
Außer der oben beschriebenen Dichotomie von zytosolischen Peptiden, die auf MHC I und sekretorischen, exogenen Proteinen, die auf MHC II präsentiert werden, gibt es noch das Phänomen der *Kreuzpräsentation*. Dies bezeichnet im allgemeinen die Präsentation von Peptiden extrazellulären Ursprungs auf MHC Klasse I, aber auch von zytosolischen Peptiden auf MHC II-Molekülen (Heath und Carbone, 1999). Während die Beladung von MHC II mit endogenen zytosolischen Peptiden noch leicht vorstellbar ist, ist der Mechanismus der Peptidbeladung von extrazellulären Proteinen auf MHC I nicht geklärt. In Diskussion sind Peptide gebunden an die Hitzeschockproteine HSP70, HSP90 oder gp96 (Suto und Srivastava, 1995), Makropinozytose von extrazelluläre Antigenen (Norbury et al., 1997) und die Aufnahme ganzer apoptotischer Zellen durch Dendritische Zellen. Die Kreuzpräsentation ist in vivo von TAP abhängig (Huang et al., 1996), das heißt, daß die Antigene über das Zytosol mit Hilfe von TAP in das ER gelangen und dort normal auf MHC I geladen werden.

Zusätzlich zu den klassischen MHC I und II Molekülen gibt es auch nicht-klassische MHC Moleküle. Nicht klassische MHC II Moleküle sind HLA-DM (in der Maus H2-M) und HLA-DO (H2-O). DM und DO sind nicht polymorph, binden keine Peptide und kommen nur begrenzt an die Zelloberfläche (Arndt et al., 2000). Die Rolle von DM als Katalysator für den Austausch von CLIP zu stabil bindenden Peptiden wurde oben beschrieben. Die Rolle, die DO als Chaperon für DM spielt, ist jedoch noch umstritten (Denzin et al., 1997; Kropshofer et al., 1998).

### 1.1.3 T-Zell Reifung

T-Zellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen der fötalen Leber bzw. des Knochenmarks in Erwachsenen ab. Vorläufer-T-Zellen migrieren in den Thymus. Sie exprimieren weder den TCR, noch CD4 oder CD8. Im Thymuskortex beginnen diese Zellen mit der Rekombination der TCR  $\beta$ -Kette. Die Zellen, die gerade die  $\beta$ -Kette rekombinieren, werden Pro-T Zellen genannt und befindet sich im sogenannten doppelnegativem ( $CD4^-/CD8^-$ ) Stadium (DN) (Abbas et al., 2000) (siehe Abb. 1.2). Die erfolgreich rekombinierte  $\beta$ -Kette wird zusammen mit einer surrogat pre-T $\alpha$ -Kette im Komplex mit CD3 und der  $\zeta$ -Kette an der Zelloberfläche exprimiert. Die Expression dieses pre-T $\alpha$ -TCR $\beta$  Komplexes führt zur Inhibition einer weiteren Rekombination des TCR- $\beta$  Lokus auf beiden Chromosomen (allele Exklusion), zur Proliferation und zur Expression von CD4 und CD8. Die Zellen werden dann doppelpositive Thymozyten (DP) genannt. In den DP-Zellen startet die Rekombination der TCR- $\alpha$ -Kette. Erfolgreich rekombinierte TCR $\alpha$ -Ketten werden zusammen mit der TCR $\beta$ -Kette niedrig auf der Zelloberfläche exprimiert. Da es für die  $\alpha$ -Kette jedoch keine allele Exklusion gibt, gibt es weitere Rekombinationen bis die Zelle positiv selektioniert ist. Dies führt dazu, daß ca. 30% der peripheren T-Zellen zwei unterschiedliche TCR  $\alpha$ -Ketten exprimieren (Padovan et al., 1993).

DP Zellen, die beide TCR-Ketten exprimieren, unterliegen einer strengen Selektion, der positiven und negativen Selektion. Nur etwa 5% der generierten DP-Zellen überleben dies (Huesmann et al., 1991).



**Abb. 1.2: Thymozytenreifung dargestellt anhand einer FACS-Analyse der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8.** Die Reifung erfolgt nach den Pfeilen von DN (doppelnegativen CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) zu DP (doppelpositiven CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) zu SP (einzelpositiven CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>). Die Figur wurde entnommen und verändert aus: Abbas et al. 2000, Cellular and molecular immunology. (Es wurden jedoch auch andere Reifungswege gezeigt: vom DN über ein SP-Stadium zum DP-Stadium.) Die positive Selektion erfolgt im DP-Stadium. Die negative Selektion im DP- und beim Übergang zum SP- sowie im SP-Stadium. Ein Überblick über die Thymozytenreifung ist auch in Tabelle 4 auf Seite 78 gegeben.

An den stochastisch erzeugten TCR werden hohe Anforderungen gestellt. Er muß einerseits eines oder mehrere der eigenen MHC-Moleküle erkennen können, daß heißt er muß eine niedrige Affinität zu eigenen MHC's haben. Dies ist notwendig, damit später fremde Peptide im Komplex mit eigenem MHC erkannt werden können (*MHC-Restriktion*, (Zinkernagel und Doherty, 1974)). Zum anderen darf die Affinität zum eigenen MHC und zu eigenem MHC mit gebundenen Selbstpeptiden nicht zu hoch sein, damit die periphere T-Zelle nicht durch eigenes MHC alleine oder durch Selbstpeptide auf eigenen MHC's aktiviert, und so zur autoreaktiven T-Zelle wird (*Klonale Deletion* (Burnet, 1959; Kappler et al., 1987)).

Für die positive Selektion der DP Zellen muß eine schwache Interaktion des TCR mit eigenem MHC erfolgen. Dabei werden auch eigene Peptide erkannt und beeinflussen somit das T-Zell Repertoire. Alle DP-Zellen, die keine eigenen MHC-Peptid Komplexe erkennen, werden nicht gerettet und sterben programmiert durch Apoptose (Death by neglect). Die Mechanismen der Apoptose sowohl für die positive, als auch für die negative Selektion sind nicht aufgeklärt. (Sebzda et al., 1999). Für die passiv ausgelöste positive Selektion spielt wahrscheinlich der BCL-2 Signalweg eine wichtige Rolle, da durch fehlende Überlebensstimuli die Expression von antiapoptotischen BCL-2 sinkt. Die Apoptose der negativen Selektion wird aktiv durch ein zu starkes TCR-Signal induziert, und ist unabhängig von antiapoptotischen BCL-2 Proteinen. Sie ist jedoch auch größtenteils unabhängig von Fas oder TNF (Page et al., 1998; Van Parijs et al., 1998).

Im Zuge der positiven Selektion wird einer der Korezeptoren, CD8 oder CD4 runterreguliert. Thymozyten, die Peptide im Kontext mit MHC I erkennen, behalten CD8, Thymozyten, die Peptid-MHC II Komplexe erkennen, exprimieren CD4.

Während die positive Selektion vorwiegend durch kortikale Thymus-Epithelzellen vermittelt wird (Anderson et al., 1994), kann die negative Selektion sowohl durch Thymus-Epithelzellen, als auch durch thymische DC's (Brocker et al., 1997; Volkmann et al., 1997)

induziert werden. Die positive Selektion erfolgt im Kortex und an der Grenze zur Medulla, die negative Selektion an der Grenze zur Medulla und in der Medulla. Die Aviditätsschwelle, der negativen Selektion im Thymus liegt unter der Schwelle, die eine Aktivierung der peripheren T-Zellen induziert (Pircher et al., 1991).

#### 1.1.4 Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen

Reife Thymozyten verlassen den Thymus und zirkulieren im Blut. Naive, einzelpositive T-Zellen in der Peripherie exprimieren den Lymphknoten homing Rezeptor L-Selektin (CD62L). Die Expression von CD62L ermöglicht die Extravasation der T-Zellen aus der Blutbahn in die Lymphknoten. (Butcher und Picker, 1996; Campbell und Butcher, 2000).

Trifft die T-Zelle im Lymphknoten auf eine aktivierte Dendritische Zelle (DC), die Peptid-MHC-Komplexe präsentiert, für welche die T-Zelle spezifisch ist, kommt es zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle. Damit naive T-Zellen aktiviert werden können, muß die DC während der angeborenen Immunantwort bereits durch mikrobielle Produkte wie LPS oder Zytokine wie IFN- $\gamma$  aktiviert worden sein. Reife, aktivierte DC's haben eine sehr hohe Expression von MHC I und II sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Bindet der TCR einer T-Zelle an ein Peptid-MHC-Komplex stärker, als an Selbst-Peptid-MHC so bleibt dieser Rezeptor einige Sekunden länger an diesen Komplex gebunden. Dies ermöglicht dem Korezeptor CD4 bzw. CD8, der vorher nicht spezifisch mit dem TCR verbunden war, an das MHC-Molekül zu binden und einen räumlich nahen Komplex mit dem TCR-Komplex zu bilden (Grakoui et al., 1999). In diesem Komplex kann die an den Korezeptor gebundene Tyrosinkinase LCK die Moleküle CD3 und die  $\zeta$ -Kette an ITAM-Motiven (engl.: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) phosphorylieren. Dies führt über die Aktivierung der Tyrosinkinase ZAP-70 zu einer breiten Signalkaskade und damit zur Proliferation der T-Zellen.

Die Affinität des TCR zum MHC-Peptid ist relativ niedrig und die Bindung sehr instabil. Dies führt dazu, daß die Interaktion zwischen TCR und MHC-Peptid nur wenige Sekunden andauert (Corr et al., 1994; Lyons et al., 1996). Zudem sind jeweils nur wenige MHC-Moleküle einer APC mit dem Peptid besetzt, für das der TCR spezifisch ist. Wahrscheinlich muß die T-Zelle daher die APC "abscannen" und es kommt zu einem seriellen "Triggering", indem viele TCR's einer T-Zelle von einem MHC-Peptid Komplex aktiviert werden (Valitutti und Lanzavecchia, 1997; Viola und Lanzavecchia, 1996). Dadurch reichen ca. 50-100 Peptid-MHC-Komplexe auf einer APC zur Aktivierung von T-Zellen (Demotz et al., 1990; Harding und Unanue, 1990) und bereits ein einziger Peptid-MHC-Komplex auf einer Zielzelle kann zur Lyse durch aktivierte zytotoxische T-Zellen (CTL's) führen (Sykulev et al., 1996).

Kostimulatorische Moleküle wirken einerseits, indem sie die Adhäsion zwischen der T-Zelle und der APC verstärken und dadurch die Interaktion zwischen TCR und MHC-Molekülen verlängern, und andererseits direkt durch Signaltransduktion. Kostimulatorische Wirkung auf T-Zellen haben CD28 (bindet CD80 und CD86), CD2 (bindet CD48) und LFA-1 (bindet ICAM-1). Zusätzlich gibt es weitere CD28 homologe, akzessorische Moleküle, wie CTLA-4 und ICOS, die jedoch nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert werden. CTLA-4 hat eine 500fach höhere Affinität zu CD80 und CD86 als CD28 und antagonisiert die Wirkung

von CD28. Ohne Kostimulation reagiert eine naive T-Zelle entweder gar nicht auf das präsentierte Peptid oder wird anerg (*2-Signale Hypothese* (Bretscher und Cohn, 1970)).

Die Aktivierung von naiven T-Zellen führt zur massiven Proliferation (klonale Expansion) und zur *Differenzierung* in Effektorzellen. CD4-Zellen differenzieren je nach Stimulus durch die APC oder des umgebenden Mikromilieus entweder in T-Helfer 1 (Th1)- oder in T-Helfer 2 (Th2)-Zellen. Die Anwesenheit von IL-12 während der Aktivierung einer CD4-T Zelle induziert die Differenzierung in Th1-Zellen. Hat sich im Mikromilieu der Aktivierung IL-4 angesammelt, so differenzieren die CD4-Zellen in Th2-Zellen. Th1-Zellen sekretieren IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF. Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-10, IL-5 und IL-13. Die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 wirken antagonistisch aufeinander. IL-10 inhibiert die Sekretion von IL-12 und TNF, und unterdrückt die Expression von MHC II und Kostimulatoren auf APC's. Dadurch, daß IL-2 als Wachstumsfaktor für Th1- und IL-4 als Wachstumsfaktor für Th2-Zellen wirkt, expandiert jede T-Helferzell-Subpopulation die Expansion der eigenen Population und unterdrückt die Bildung und Effektorfunktion der anderen (Romagnani, 1997). CD8 T-Zellen differenzieren in CTL's, die mit Hilfe von Perforin und Granzym B virusinfizierte T-Zellen lysieren können.

Aktivierete T-Zellen sind, im Gegensatz zu naiven, große Zellen mit viel Zytoplasma (Blasten) und exprimieren sogenannte *Aktivierungsmarker*. Dies sind Oberflächenproteine, die meist mit der Extravasation in periphere Gewebe, sowie der Migration und der Retention in diesen Geweben in Zusammenhang stehen. Aktivierete Zellen haben eine niedrige Expression von CD62L, dies ermöglicht das Verlassen des Lymphknotens und verhindert ein Einwandern in andere Lymphknoten. Die Hochregulation von CD44 ermöglicht die Bindung an Hyaluronsäure, ein Bestandteil von Proteoglykanen der extrazellulären Matrix und von Endothelien, und somit die Extravasation und Retention in Geweben. Die Hochregulation und Aktivierung der Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und VLA-4 (CD49d/CD29), die an ICAM 1 und ICAM 2 bzw. an VCAM-1 auf aktivierten Endothelien binden, fördern ebenfalls die Extravasation. Entzündungen aktivieren über die Zytokine TNF und IL-1 die vaskulären Endothelien und damit die Expression der Liganden der oben beschriebenen Aktivierungsmarker. Die Extravasation wird gesteuert durch Chemokine wie z.B. Mig, SDF-1, MIP, Rantes u.a., die während der Entzündung freigesetzt werden, an Hyaluronsäuren binden und damit einen Gradienten von den Endothelien zum Ort der Infektion formen. Die Bindung an die Chemokinrezeptoren auf T-Zellen erhöht die Affinität der Integrine und bewirkt damit die Extravasation und Migration der Zellen in Richtung des Gradienten (Campbell und Butcher, 2000).

Am Ort der Entzündung werden antigenspezifische Effektorzellen durch die Präsentation von Antigen durch lokale APC's zur Ausübung der unterschiedlichen Effektorfunktionen aktiviert. Die Aktivierungsschwelle ist hier jedoch geringer als bei naiven T-Zellen. Somit können sowohl nicht professionelle APC's, als auch APC's ohne kostimulatorische Moleküle diese Aktivierung hervorrufen. Werden CTL's über MHC I aktiviert, so lysieren sie die infizierte Zelle, die das Antigen präsentiert. Th1- und Th2-Zellen üben ihre Effektorfunktion durch ihre Zytokine aus. Aktivierete Th1-Zellen stimulieren über den CD40 Liganden (CD40L) und IFN- $\gamma$  Makrophagen zum Töten von phagozytierten Mikroben und B-Zellen zum Isotypenwechsel und zur Produktion und Sekretion von Komplement-bindenden, opsonisierenden IgG2a Antikörpern. Th2-Zellen aktivieren eine eher humorale Immunantwort und inhibieren die zelluläre Immunität. Durch IL-4 werden B-Zellen zur Proliferation und zur Produktion von neutralisie-

renden, IgG1 und IgE Antikörpern veranlaßt. Makrophagen werden durch IL-10 und IL-4 inhibiert (Abbas et al., 2000).

Ist das Antigen eliminiert, so wird die Immunantwort abgeschaltet. Die Effektorzellen sterben durch Apoptose, induziert durch abfallende Überlebensstimuli wie IL-2, Antigen und Kostimulation (passive Apoptose). Dies wird durch abfallende BCL-2 Expression induziert (Van Parijs und Abbas, 1998; Van Parijs et al., 1998).

Einige Zellen differenzieren zu Memory-Zellen, die, antigenunabhängig eine sehr lange Lebenszeit haben (Murali-Krishna et al., 1999). Memory-Zellen exprimieren auch einige der Aktivierungsmarker und können sich so frei im Gewebe bewegen, und bei einer Zweitinfektion direkt im Gewebe (in situ) aktiviert werden und so zu einer schnelleren und effektiveren Immunantwort beitragen (Mackay, 1991).

## 1.2 Toleranz von T-Zellen

Da die TCR's zufällig aus den Untereinheiten rekombiniert werden, entstehen zwangsläufig autoreaktive TCR's mit einer hohen Affinität zu Selbst-MHC bzw. Selbst-Peptiden, gebunden an Selbst-MHC's. Zwei Tatsachen verdeutlichen dies: 1. Die Reaktion gegenüber allogenen Geweben der eigenen Spezies. Bis zu ca. 10% der T-Zellen werden durch Fremd-MHC's, im Komplex mit Fremd- oder Selbst-Peptiden aktiviert. Hierbei werden sowohl polymorphe MHC-Reste, als auch Peptid-Reste erkannt (Kranz, 2000). Diese allogenen aktivierten T-Zellen werden nach einer Knochenmarkstransplantation durch allogene hämatopoetische Zellen (Dendritische Zellen) des Transplantatdonors im Thymus deletiert (Kappler et al., 1987; Sprent et al., 1975). 2. T-Zellen aus Tieren, in denen nur eines oder wenige Peptide präsentiert werden, sind reaktiv gegen Gewebe aus syngenischen Tieren mit einem normalem Peptidrepertoire (Fukui et al., 1997; Surh et al., 1997). Auch hier deletieren thymische Dendritische Zellen aus syngenischen Mäusen mit normaler Antigenpräsentationskapazität die reaktiven Zellen.

### 1.2.1 Zentrale Toleranz: Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus

Die Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus ist wahrscheinlich der wichtigste Mechanismus zur Erzeugung der Toleranz gegen Selbstantigene. Es wird geschätzt, daß mehr als 50% der positiv selektionierten Thymozyten durch die negative Selektion deletiert werden (van Meerwijk et al., 1997).

Die Zellen, die am stärksten die negative Selektion vermitteln, sind thymische DC's, da diese im Thymus die stärkste MHC I und MHC II Expression zeigen. Jedoch auch thymische Epithelzellen können bei hoher Antigenkonzentration als APC's negative Selektion im Thymus bewirken (Volkman et al., 1997). Die hauptsächlich präsentierten Peptide sind Antigene, die im Thymus selbst produziert werden und Antigene aus der Zirkulation (Kyewski et al., 1984; Zal et al., 1994). Zudem wurde gezeigt, daß einige gewebespezifische Antigene "ektopisch" von medullären thymischen Epithelzellen exprimiert werden und damit die Deletion autoreaktiver Zellen bewirken (Hanahan, 1998; Klein et al., 1998). Die Expression eines Autoantigens in Thymus-Epithelzellen der Medulla kann jedoch anstelle von Deletion auch zur Anergie der autoreaktiven Thymozyten führen (Schönrich et al., 1992).



Außer der Deletion wurde auch gezeigt, daß autoreaktive T-Zellen, deren Antigen von kortikalen Epithelzellen exprimiert wird, die Expression des autoreaktiven (transgenen) TCR runterregulieren und andere endogene  $\alpha$ -Ketten exprimieren (Rezeptor-Editing) (McGargill et al., 2000). In einem anderen System wurde der Verlust der transgenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten in autoreaktiven T-Zell Klonen gezeigt, die endogene TCR's exprimierten (Bluthmann et al., 1988).

Eine weitere Form der thymischen Toleranzinduktion ist die Generierung von regulatorischen Zellen (Sakaguchi, 2000; Seddon und Mason, 2000). In mehreren Systemen wurde die inhibitorische Wirkung von reifen CD4-SP CD25<sup>+</sup>-Thymozyten auf die Entwicklung von autoimmunen Erkrankungen in lymphopenischen Tieren gezeigt (Itoh et al., 1999; Seddon und Mason, 1999b). Ob die regulatorischen Zellen bereits im Thymus antigenspezifisch sind ist jedoch nicht klar. Jedenfalls ist die Existenz des Autoantigens in der Peripherie zur Reifung oder zum Überleben von antigenspezifischen, regulatorischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen wichtig (Seddon und Mason, 1999a).

### 1.2.2 Periphere Toleranz

Trotz der oben beschriebenen thymischen Mechanismen der Toleranzinduktion wie Deletion oder Editing gelangen noch viele autoreaktive T-Zellen in die Peripherie. Dies wird durch folgende Tatsachen verdeutlicht: 1. In der Peripherie von gesunden Individuen werden T-Zellen gefunden, die durch Stimulation mit körpereigenen Antigenen in vitro aktiviert werden können. 2. Spontane T-Zell abhängige Autoimmunerkrankungen beruhen auf der Aktivierung von autoreaktiven peripheren T-Zellen. 3. Gegen viele Autoantigene kann in vivo eine Autoimmunantwort hervorgerufen werden, wenn das Autoantigen zusammen mit potenten Adjuvantien appliziert wird.

Gründe für autoreaktive, periphere T-Zellen können die fehlende thymische Expression von gewebespezifischen Antigenen oder eine zu niedrige Konzentration des Antigens in der Zirkulation sein. Zudem können Antigene im Thymus entweder in anderen Spleißvarianten exprimiert (gezeigt für PLP (Klein et al., 2000)), oder anders prozessiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist, daß das Antigen zwar im Thymus exprimiert wird, jedoch eine sehr schwache Affinität zum MHC-Molekül hat und daher autoreaktive T-Zellen nur ungenügend deletiert werden (Liu et al., 1995).

Da nur relativ wenige Individuen an einer Autoimmunerkrankung leiden, muß es effektive Mechanismen der Toleranzinduktion in der Peripherie geben. Der einfachste Mechanismus keine Immunantwort gegen ein Autoantigen hervorzurufen ist die immunologische "Ignoranz". Das bedeutet, daß die spezifischen T-Zellen durch das Autoantigen weder aktiviert, noch tolerisiert werden. Dieser Mechanismus beruht wahrscheinlich darauf, daß das Antigen niedrig, lokal im Gewebe exprimiert wird, und naive T-Zellen damit nicht in Berührung kommen. Da dies im eigentlichen Sinne keine T-Zell Toleranz darstellt, kann eine Aktivierung der naiven T-Zellen leicht zur Autoimmunreaktionen führen (Ohashi et al., 1991). Viele Pathogene haben Epitope, die strukturell ähnlich sind zu Autoantigenen (Hausmann und Wucherpfennig, 1997). Würden alle autoreaktiven T-Zellen ihre Autoantigene einfach nur ignorieren, so würden die meisten Infektionen wahrscheinlich in Autoimmunkrankheiten enden. Mit Hilfe der verschiedensten transgenen Mäuse wurden unterschiedliche Toleranzmecha-

nismen sowohl gegen Autoantigene der Peripherie, als auch gegen fremde Neoantigene aufgedeckt.

#### Direkte Mechanismen der Toleranzinduktion von T-Zellen:

Auf die Expression von Antigenen in peripheren Geweben reagieren T-Zellen sowohl reversibel, als auch irreversibel. Reversible Änderungen sind die Herunterregulation des TCR oder des Korezeptors (CD8/CD4) (Tafari et al., 1995) oder beides (Schönrich et al., 1991). Diese T-Zellen sind in vivo tolerant. Durch eine hohe IL-2 Konzentration mit Antigenstimulation wird der Rezeptor oder Korezeptor jedoch wieder hochreguliert und die T-Zellen verlieren die Toleranz (Toleranzbrechung) (Limmer et al., 1998; Schönrich et al., 1991). Irreversible Änderungen sind die Ausbildung von *Anergie* oder die *periphere Deletion* (Rellahan et al., 1990). Anergie T-Zellen können auch mit IL-2 Zugabe nicht mit Antigen stimuliert werden, jedoch kann ein weiterer Antigenkontakt zur Deletion führen. Der Begriff Anergie wird jedoch oft auch für reversible Toleranzmechanismen (siehe oben) verwendet. Die Ausbildung von Toleranz kann in einem mehrstufigen Prozeß von der Herunterregulation des TCR und/oder des Korezeptors über die Anergie zur Deletion ablaufen (Arnold et al., 1993; Ferber et al., 1994). Werden T-Zellen kontinuierlich mit hohen Mengen des spezifischen Antigens (allo oder auto) konfrontiert, so führt dies zu einer Expansion der Zellen und daraufhin zum aktivierungsinduzierten Zelltod durch Apoptose (AICD). Dies ist abhängig von einer hohen IL-2 Konzentration und Fas/FasL bzw. TNF/TNFR Interaktion (Zheng et al., 1995). Eine weitere Form der irreversiblen Toleranz ist die periphere Rekombination des TCR, gezeigt für die transgene  $\beta$ -Kette in Tieren, mit peripherer Expression eines bakteriellen Superantigens (McMahan und Fink, 1998).

Der Begriff der Anergie stammt vor allem aus in vitro Experimenten mit CD4<sup>+</sup>T-Zellklonen. Wurden diese ohne Kostimulation (CD80/86 oder anti-CD28 Antikörper) zum ersten Mal mit Antigen aktiviert, so wurden die Zellen anerg und reagierten auf folgende Antigenstimulation nicht mehr. Für diesen anergen Zustand konnten mehrere biochemische Ursachen (Aktivierungsblockaden) identifiziert werden, die eine defekte TCR-Signaltransduktion bewirken, wie z.B. ein Block von Ras- und PKC-Aktivierung oder die gestörte Rekrutierung von ZAP70 zur CD3 $\zeta$ -Kette. In vivo anergisierte T-Zellen sind jedoch biochemisch nicht so gut charakterisiert (Abbas et al., 2000; Salojin et al., 1998). Auch in vivo wird die fehlende Kostimulation, entweder durch nicht aktivierte professionelle APC's, oder durch Zellen im Gewebe, für die Toleranzinduktion von autoreaktiven, naiven T-Zellen verantwortlich gemacht (Guerder et al., 1994; Lenschow et al., 1992).

#### Deviation:

In mehreren Systemen beruht die Toleranzinduktion auf unterschiedlichen Formen der Deviation. Das heißt, daß die Immunantwort meist über Zytokine in eine andere Form der Reaktion umgeleitet werden. Dabei werden die T-Zellen nicht anerg, sondern reagieren ihrerseits auf Antigenstimulation mit der Sekretion von suppressiven Zytokinen. Der Begriff Deviation wird meist im Zusammenhang gebracht mit der Induktion einer protektiven Th2-Antwort im Falle von T-Zell-induzierten Autoimmunerkrankheiten oder einer Th1-Antwort im Falle von allergischen Reaktionen. Bei T-Zell basierten Autoimmunerkrankungen wurde der

gutartige Verlauf mit Th2-Zellen korreliert (Scott et al., 1994) und der Ausbruch mit einer Verschiebung von Th2- zu Th1-Zellen (Liblau et al., 1995). Auch die Induktion von Toleranz wurde mit einer Th2-Antwort korreliert (Pearson et al., 1997). In einem anderen System wurde jedoch gefunden, daß in vitro generierte Th2-T-Zellen, obwohl verzögert, in Rag-Knockout (ko)-Tieren dieselbe T-Zell basierte Autoimmunreaktion hervorrufen können wie die in vitro generierten Th1-Zellen (Lafaille et al., 1997). Da NKT-Zellen bei Antigenstimulation IL-4 sekretieren, könnten diese Zellen wichtige Mediatoren der Th2-Deviation darstellen (Yoshimoto et al., 1995).

#### Regulation:

Sehr ähnlich zur oben beschriebenen Deviation ist der Toleranzmechanismus der Regulation. So induzieren z.B. oral aufgenommene Antigene regulatorische T-Zellen, die über TGF- $\beta$  die Immunantwort anderer naiver T-Zellen supprimieren (*Orale Toleranz*) (Weiner, 1997). Eine experimentelle Induktion von regulatorischen T-Zellen gegen Transplantationsantigene ist die Gabe von nicht depletierenden, monoklonalen Antikörpern gegen CD4 und/oder CD8 zum Zeitpunkt der Transplantation. Diese Form der Toleranzinduktion läßt sich über mehrere Mäuse hinweg transferieren und wird daher *infektiöse* Toleranz genannt (Cobbold und Waldmann, 1998; Qin et al., 1993). Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Prävention bestimmter Autoimmunerkrankungen wurde bereits unter der thymischen Toleranzinduktion angesprochen und wird anhand des Tiermodells EAE dargestellt (siehe unten). Auch für die Aufrechterhaltung der neonatal induzierten Toleranz im adulten Tier gegenüber peripheren Gewebe- oder transplantierten Fremdanitigenen sind möglicherweise regulatorische T-Zellen verantwortlich (Alferink et al., 1998). Für die meisten Formen der Regulation ist die Sekretion von TGF- $\beta$  durch regulatorische T-Zellen, auch T<sub>reg</sub> oder Th3 genannt, verantwortlich. TGF- $\beta$  inhibiert die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen sowie die Aktivierung von APC's.

Verschiedene Organe werden als *immunprivilegiert* bezeichnet. Dies sind Organe, die nach Transplantation in histoinkompatible Empfänger verzögert abgestoßen, bzw. in denen andere immunogene Allotransplantate nicht oder nur verzögert abgestoßen werden. Dies sind v.a. das Gehirn, die Augenlinse und Kornea, Testes und Ovarien, sowie die Leber. Da auch die Plazenta und der Fötus Alloantigene tragen und nicht abgestoßen werden, werden auch diese oft als immunprivilegiert bezeichnet. Die bisher bekannten Mechanismen der verzögerten Abstoßung sind: 1. Eine physikalische Barriere zu dem Organ (z.B. die Blut-Hirn Schranke im Gehirn oder die Sertoli-Zellen für Testes). 2. Eine defiziente oder andersartige lymphatische Drainage (Vordere Augenkammer, Gehirn). 3. Reduzierte Immunogenität durch veränderte MHC I und/oder MHC II Expression (Gehirn, Plazenta und Fötus). 4. Expression von FasL (Testes, Plazenta, Kornea und Leber). 5. Ein immunsuppressives Mikromilieu (v.a. TGF- $\beta$ : Vordere Augenkammer, Testes, Plazenta, Leber). In einigen Experimenten wurde systemische, aktive Immundeviation gezeigt, wenn allogene Transplantate in immunprivilegierte Organe gesetzt wurden (Ksander und Streilein, 1994; Streilein, 1996). Das Konzept der Toleranzbildung gegenüber immunprivilegierten Organen durch Deletion über FasL (Bellgrau et al., 1995; Griffith et al., 1996) ist jedoch umstritten, da einige Experimente nicht reproduzierbar waren, bzw. die FasL-Expression nicht essentiell für den immunprivilegierten

Status war (Rogers et al., 1998). In FasL-transgenen Tieren trat sogar eine verstärkte Immunreaktion gegen das FasL-exprimierende Organ ein (Allison et al., 1997; Kang et al., 1997).

In mehreren Systemen wurde gezeigt, daß naive T-Zellen spezifisch in den Geweben, die die Autoantigene exprimieren, tolerisiert werden (Alferink et al., 1998; Brabb et al., 2000). Dies stellt ein konzeptionell wichtiges Modell dar, da es erklärt, wieso naive T-Zellen periphere Antigene nicht ignorieren, sondern spezifisch dagegen tolerisiert werden.

### 1.3 Autoimmunität

Ungefähr 4% der Bevölkerung leidet an Autoimmunkrankheiten. Einige Beispiele dafür sind: Insulin abhängige Diabetes mellitus (IDDM ca. 0,4%), Rheumatoide Arthritis (RA ca. 1%), Multiple Sklerose (MS ca. 0,1%), Systemischer Lupus erythematoses (SLE ca. 0,1%), Myasthenia gravis, Spondylitis ankylosans (SA ca. 0,13%) (Vyse und Todd, 1996).

Auf folgende Fakten beruht die Bezeichnung autoimmun für die oben beschriebenen Krankheiten: Meist werden Antikörper gegen Selbstantigen gefunden, die die Krankheit direkt (Myasthenia Gravis) oder eher indirekt (SLE) verursachen, oder damit assoziiert sind (RA, MS, IDDM). In einigen Erkrankungen wird die Infiltration von T-Zellen und Monozyten in die befallenen Organe gefunden (MS, RA, IDDM). Bei diesen infiltrierten T-Zellen konnten teilweise die Spezifitäten für gewebespezifische Antigene demonstriert werden (z.B. MBP oder PLP in MS, Insulin oder GAD in IDDM). Des weiteren gibt es für viele Autoimmunkrankheiten Tiermodelle, in denen die Krankheit entweder spontan oder induziert auftritt. Insbesondere die Induktion mittels Gewebekomponenten oder gewebespezifischer Antigene in einem starken Adjuvants (Freund et al., 1953; Rivers et al., 1933), zeigte, daß Krankheiten, die denen im Menschen stark ähnlich sind (z. B. MS oder RA), einen autoimmunen Ursprung haben können. Die Krankheiten sind in Tiermodellen transferierbar durch den adoptiven Transfer von Antikörpern oder T-Zellen. Für die meisten Autoimmunkrankheiten ist die größte genetische Assoziation die, mit MHC-Genen, was auf eine besondere Rolle des adaptiven Immunsystems in diesen Erkrankungen hinweist. Die Bezeichnung Autoimmunkrankheit ist jedoch für einige dieser Erkrankungen umstritten (z.B. MS), da die Immunreaktion gegen ein eventuell noch nicht gefundenes Pathogen im betroffenen Gewebe schwer zu unterscheiden ist von einer Immunreaktion gegen körpereigene Gewebe. Zum Beispiel wurde bis zur Entdeckung des Bakteriums *Borrelia burgdorferi* als Verursacher der Lyme Krankheit, die dadurch hervorgerufenen Krankheitszeichen, für eine juvenile Form der Rheumatoiden Arthritis gehalten.

Autoimmunkrankheiten werden, je nach betroffenen Organ oder Gewebe, in organspezifische (MS, IDDM) oder systemische (SLE, RA) Erkrankungen eingeteilt. Grundsätzlich gibt es eher Antikörper-basierte oder T-Zell-basierte Autoimmunerkrankungen. Durch Antikörper werden Gewebe entweder direkt geschädigt (Goodpasture-Syndrom: Antikörper gegen Basalmembran von Glomeruli der Niere), in ihrer Funktion gestört wie z.B. Myasthenia gravis (Antikörper gegen Acetylcholinrezeptor), oder durch die Ablagerung von Immunkomplexen mit gewebeunspezifischen Antigenen wie z.B. bei SLE (Antikörper gegen Kernproteine oder Nukleinsäuren) geschädigt. T-Zell-basierte Erkrankungen beruhen meist auf der Einwanderung von Th1-Zellen, die über Zytokine die Monozyteninfiltration und -aktivierung verursa-

chen. Dadurch wird eine inflammatorische Reaktion verursacht, die zur Gewebeschädigung führt. Einige dieser T-Zell-basierten Erkrankungen scheinen unabhängig (MS, RA) und andere abhängig von CTL's zu sein (IDDM). Generell fördern Bedingungen, die Th1-Antworten verursachen, die Entstehung von T-Zell-basierten Autoimmunerkrankungen, während Th2-induzierende eher die Antikörper-basierten Erkrankungen fördern (Wilder, 1998).

Für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten sind sowohl genetische Faktoren, als auch Umwelteinflüsse verantwortlich. Die Konkordanz von monozygoten Zwillingen liegt bei Erkrankungen wie IDDM, MS, RA und SLE bei ca. 30-50%, während sie bei dizygoten Zwillingen nur bei ca. 5% liegt. Das Risiko eine bestimmte Autoimmunkrankheit zu bekommen wurde mit unterschiedlichen MHC-Allelen korreliert. Die meisten Autoimmunkrankheiten sind mit MHC Klasse II Allelen korreliert. So haben DR2-positive Individuen z.B. ein fünffach erhöhtes Risiko an MS zu erkranken. Eine Ausnahme bildet die Erkrankung Spondylitis ankylosans, die mit einem MHC I-Allel assoziiert ist. Hier wird die größte genetische Assoziation bei Autoimmunkrankheiten mit einem ca. 90fach erhöhtem Risiko für Individuen, mit dem MHC I-Allel HLA-B27 gefunden. Auch bestimmte Inzuchtmausstämme entwickeln spontane Autoimmunkrankheiten, wie z.B. die NOD-Maus (IDDM) oder die (NZB x NZW)<sub>F1</sub>-Maus (SLE). Andere Mausstämme wie z.B. SJL/J oder PL/J sind wiederum für eine experimentell induzierte Erkrankung (EAE) besonders sensitiv. Für die spontane Ausbildung von Autoimmunkrankheiten oder die besondere Empfänglichkeit sind sowohl MHC-, als auch nicht-MHC-Gene verantwortlich (Vyse und Todd, 1996).

Einige Autoimmunkrankheiten sind besonders geschlechtsspezifisch. Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten liegt für SLE bei 10:1, für RA bei 3:1, für MS bei 2:1 und für SA bei 1:3 (Abbas et al., 2000; Steinman, 1996). Auch bei (NZB x NZW)<sub>F1</sub>-Tieren entwickeln Weibchen die Krankheit ausgeprägter. In Weibchen verzögert die Gabe von Androgenen und in Männchen verschlimmert die Östrogengabe die Krankheit. In diesem Modell konnte die anti-DNA Antikörperkonzentration direkt mit dem Verhältnis von Östrogen zu Androgen korreliert werden (Shoenfeld und Isenberg, 1989). Bei anderen Erkrankungen wie RA hat die Östrogengabe jedoch eher einen positiven Einfluß auf den Krankheitsverlauf, daher ist die direkte Korrelation des Geschlechterverhältnis der Autoimmunkrankheit mit dem Hormonstatus nicht möglich. Frauen haben generell einen höheren Antikörpertiter (IgG und IgM) als Männer und sind daher eher für Antikörper-basierte Autoimmunkrankheiten prädestiniert (Shoenfeld und Isenberg, 1989).

Verschiedene Umweltfaktoren werden für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verantwortlich gemacht. Auffällig ist die geographische Verteilung von MS und IDDM. In der weißen Bevölkerung ist die Prävalenz an MS zu erkranken in Regionen mit gemäßigtem Klima am höchsten, wobei das Aufenthaltsgebiet der ersten 15 Lebensjahre entscheidend ist (Steinman, 1996). Auch für IDDM gibt es einen Nord-Süd Gradienten mit den meisten Fällen in Finnland (1,5%). Beides kann für bestimmte Infektionen in diesen Breitengraden sprechen (siehe unten). Die NOD-Maus hat jedoch in keimfreier Umgebung die höchste Inzidenz an IDDM zu erkranken, und Menschen der industrialisierten nördlichen Hemisphäre wachsen eher mit weniger Infektionen auf. Daher ist es auch möglich, daß gerade das Fehlen von Infektionen zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten beiträgt. Möglicherweise induzieren

Infektionen im Kindes- und Jugendalter, durch die erhöhte Migration von T-Zellen in die Gewebe, die Toleranz gegen Autoantigene.

Autoimmunität bedeutet den Verlust von Toleranz gegen Selbst. Eine Möglichkeit ist, daß versteckte, bzw. vorher *ignorierte* Antigene entweder den naiven ignoranten T-Zellen zugänglich gemacht werden, oder diese aktiviert werden, und dadurch Zugang zu Antigenen in den Geweben bekommen (Ohashi et al., 1991; Voehringer et al., 2000). Eine andere, ergänzende Möglichkeit ist, daß durch Entzündungen aktive Toleranzmechanismen wie Regulation oder Toleranz der T-Zellen gebrochen werden. Als Auslöser für viele Autoimmunkrankheiten sind Infektionen postuliert worden. Infektionen, bzw. Entzündungen können in Tierversuchen dem Immunsystem vorher unzugängliche Antigene zugänglich bzw. immunogen machen (Limmer et al., 1998). Sie können durch eine sogenannte bystander-Aktivierung (Coxsackie-B-Virus in IDDM (Horwitz et al., 1998)) oder durch Epitop-Spreading (Theiler's Virus in EAE (Miller et al., 1997)) Autoimmunität verursachen. Für die meisten Autoantigene gibt es außerdem sehr viele kreuzreaktive Epitope in Pathogenen (*Molekulares Mimikry* (Grogan et al., 1999; Wucherpfennig und Strominger, 1995)), deren Relevanz für Autoimmunkrankheiten jedoch nicht geklärt ist. In Mausmodellen konnte direkt molekulares Mimikry als Auslöser für Autoimmunkrankheiten gezeigt werden. So besitzt z.B. das Herpes-Simplex Virus Typ 1 ein Epitop, das kreuzreaktiv zu einem Antigen der Kornea ist. Eine Infektion des Auges mit diesem Virus führt zur Herpes Stromal Keratitis, einer entzündlichen Augenerkrankung, die zur Blindheit führt (Zhao et al., 1998). Beim Menschen führt die Infektion mit *B. burgdorferi* in ca. 10% zu einer antibiotikaresistenten Form der Arthritis. Bei solchen Patienten wurden T-Zellen isoliert, die sowohl mit einem bakteriellen Antigen (OspA), als auch mit einem Wirtsantigen (LFA-1) reagieren. Jedoch ist die Bedeutung dieser Kreuzreaktivität für die Entstehung der anhaltenden Arthritis nicht geklärt (Gross et al., 1998). Ein weiteres Beispiel ist die Infektion mit Streptokokken der Gruppe A, die durch ein kreuzreaktives Epitop zu rheumatischen Fieber und Myokarditis führen kann.

## 1.4 EAE: Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

EAE ist eines der am besten charakterisierten autoimmunen Tiermodelle. Viele wichtige Fragen der Immunologie werden damit bearbeitet. Zum Beispiel die Relevanz von Molekülen in Knockout Studien, oder die experimentell induzierte Toleranz gegenüber Autoimmunität werden damit untersucht. EAE hat viele Ähnlichkeiten mit Multiple Sklerose und wird daher als Tiermodell dafür betrachtet.

### 1.4.1 EAE als Model für Multiple Sklerose

Die Entdeckung von EAE leitet sich aus den Nebenwirkungen der ersten Tollwutimpfungen ab. In einigen Personen wurde durch Impfungen mit inaktivierten Rabies-Viren, extrahiert aus infizierten Kaninchenhirnen, eine akute Enzephalomyelitis induziert. Stuart et al. zeigte, daß dieselben Krankheitssymptome alleine durch Immunisierung mit Rückenmarksgewebe in Kaninchen, unabhängig vom Rabies Virus, auftraten (Stuart und Krikorian, 1928). Rivers et al. beschrieben als erste die experimentelle Induktion von Enzephalomyelitis in Affen. Durch wiederholte intramuskuläre Injektionen von Kaninchen-Gehirnextrakten in Affen wurden Lähmungen, begleitet von Demyelinisierungen, erzeugt (Rivers et al., 1933). Mit der Ent-

wicklung von CFA (Komplettes Freund's Adjuvants) wurde es möglich mit nur einer Injektion von Gehirnextrakten (Kabat et al., 1947; Morgan, 1946), Gehirnproteinen oder auch nur Peptiden die Krankheit zu induzieren. Seitdem wurde EAE außer in Affen, in Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten, Mäusen, Schafen, Hunden und Hühnern induziert. Auch in Menschen wurde EAE versehentlich im Labor induziert (Zamvil und Steinman, 1990).

Bisher wurden folgende Antigene als Autoantigene in den experimentell erzeugten Krankheiten identifiziert: MBP (myelin basic protein, ca. 30% der Myelinproteine), PLP (proteolipid protein, ca. 50% der Myelinproteine) (Swanborg, 1995), MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), MAG (myelin associated glycoprotein, ca. 1%) und OSP (oligodendrocyte-specific protein, ca. 7%) (Stevens et al., 1999). Bei Mäusen werden mehrere Epitope von **MBP** gefunden, mit denen enzephalitogene Klone reagieren, bzw. mit denen sich EAE induzieren läßt. In B10.PL und PL/J Tieren ist dies das dominante, N-terminale Peptid Ac1-11. Es ist acetyliert und I-A<sup>u</sup>-restringiert. Ein zweites, subdominantes Epitop, ist das I-E<sup>u</sup>-restringierte Peptid 35-47. In SJL/J werden die zentralen MBP-Peptide 89-101 (I-A<sup>s</sup>-restringiert) und 96-109 erkannt. MBP wird auch im Thymus exprimiert (Fritz und Kalvakolanu, 1995; Fritz und Zhao, 1996). Daher ist zu erwarten, daß T-Zellen, mit einem hochaffinen TCR zu MBP-Epitopen, deletiert werden. Mit Hilfe von Shiverer-Mäusen, die kein MBP exprimieren, wurde gezeigt, daß die eigentlich dominanten Epitope in B10.PL Tieren in MBP<sub>121-150</sub> liegen. Das Epitop 121-140 bildet einen sehr stabilen Komplex mit I-A<sup>u</sup> ( $T_{1/2} = 144\text{h}$ ) im Gegensatz zu Ac1-11 ( $T_{1/2} = 15\text{ min}$ ) (Harrington et al., 1998). In wt-Mäusen werden T-Zellen, die dieses Epitop erkennen, durch thymische Selektion deletiert. T-Zellen, die Ac1-11 erkennen, werden wahrscheinlich durch die niedrigere Antigendichte nicht deletiert. Der Verlauf von EAE ist unterschiedlich je nach Stamm und verwendetem Antigen. In B10.PL, induziert mit MBP, erfolgt ein akuter Schub, der, falls die Tiere daran nicht sterben, meist abklingt, und darauf folgen kleinere Schübe. In SJL/J Mäusen verläuft die mit PLP induzierte Erkrankung in charakteristischen Schüben mit Remissionen dazwischen.

EAE kann aktiv oder passiv induziert werden, es gibt keine nichttransgene, spontane Form von EAE. Bei der aktiven Induktion werden die Mäuse mit Myelinautoantigenen (siehe oben) immunisiert. Die Immunisierung erfolgt subkutan in CFA mit einer hohen Konzentration an abgetöteten *M.tuberculosis*. Dazu wird Pertussistoxin an anderer Stelle (i.p. oder i.v.) gegeben. CFA ist ein starkes Adjuvants und bewirkt eine Th1-Antwort gegen die darin emulgierten Antigene. Pertussistoxin (PT) ist eine ADP-Ribosyltransferase, die inhibitorische G-Proteine (G<sub>i</sub>) inhibiert. Die Wirkungsweise in der PT die EAE-Induktion unterstützt ist nicht geklärt. Es wird angenommen, daß PT die Extravasation in die Gewebe insbesondere durch die Blut-Hirn-Schranke erleichtert (Brabb et al., 1997; Linthicum et al., 1982). Zudem hat PT in höheren Konzentrationen einen mitogenen Effekt auf T-Zellen (Gray et al., 1989) und scheint die Anergisierung von T-Zellen zu inhibieren (Kamradt et al., 1991). Bei der passiven Induktion werden entweder spezifische T-Zell-Klone, -Linien oder T-Zellen aus anderen, vorher immunisierten Mäusen transferiert. Auch hier kann PT und/oder eine leichte Bestrahlung die Induktion verstärken. EAE ist alleine, durch aktivierte, Myelin-spezifische CD4-Zellen transferierbar.

Die Pathologie in EAE und MS (Bauer et al., 1996; Zamvil und Steinman, 1990) ist rein auf das Zentrale Nervensystem (ZNS) beschränkt. In beiden Erkrankungen treten in der wei-

ßen Substanz Plaques auf, in denen die Myelinschicht zerstört oder geschädigt ist. Charakteristisch sind sogenannte *perivaskuläre Leukozytenansammlungen (Cuffs)*. Um kleine Gefäße herum bilden sich Ansammlungen von infiltrierten Leukozyten, von denen die Demyelinisierung ausgeht. Die Blut-Hirn Schranke besteht aus Endothelzellen und die darum liegende Basallamina. Die Endothelzellen sind über Tight-Junctions miteinander verbunden und besitzen keine Fenestrae. Die zweite Barriere, die Basallamina (Glia limitans), ist eine extrazelluläre Matrix, bestehend aus Typ IV Kollagen. Zwischen Endothelien und der Glia limitans liegt der perivaskuläre Raum. Aktivierte CD4<sup>+</sup>T-Zellen, die das Integrin VLA-4 exprimieren (Baron et al., 1993), binden an aktiviertes Endothel und können durch Diapedese zwischen Endothelzellen in den perivaskulären Raum gelangen. Mit Hilfe der Proteasen Gelatinase A und B kann die Glia limitans durchdrungen werden. In MS-Läsionen wird Gelatinase B von Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen und Astrozyten exprimiert. Ist die T-Zelle spezifisch für residente Antigene, präsentiert von MHC II auf Mikrogliazellen (ZNS-Makrophagen), so wird sie restimuliert, sekretiert IFN- $\gamma$  und setzt dadurch folgende Entzündungskaskade in Gang: IFN- $\gamma$  aktiviert die residenten Mikrogliazellen und spezielle Makrophagen-ähnliche Zellen (Perizyten) im perivaskulären Raum. Die IL-1 Expression dieser Zellen führt, zusammen mit IFN- $\gamma$ , zur verstärkten Aktivierung des Endothels, d.h. zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (ICAM I und VCAM) und MHC II. Dies führt zur Rekrutierung von weiteren T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen in den perivaskulären Raum und später zum Zusammenbruch der Glia limitans in diesem Bereich. Antikörper gegen Myelinantigene aktivieren die Komplementkaskade. Makrophagen und Mikroglia werden aktiviert, phagozytieren Teile der Myelinschicht und sezernieren zytotoxische Substanzen wie NO und TNF- $\alpha$ . Auch die rekrutierten CD4-Th1 Zellen sekretieren TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$ . Dadurch kommt es zur Schädigung und Apoptose (Hisahara et al., 2001) der Oligodendrozyten, welche die Myelinschicht bilden. Aufgrund dieser Schädigung liegen die Axone der Neuronen frei und die saltatorische Fortleitung der Aktionspotentiale wird gestört. Im chronischen Verlauf führt dies zur Degeneration der Axone und wahrscheinlich zum Absterben der Neuronen (Arbizu-Urdiaín und Martínez-Yelamos, 2000).

In Mäusen und wahrscheinlich auch beim Mensch kommt es bei einer chronischen Erkrankung zu einem sogenannten *Epitop Spreading* (Lehmann et al., 1992; Tuohy et al., 1999). Das heißt, das Antigen, das als erstes erkannt wurde, bzw. mit dem die Krankheit induziert wurde, wird im Laufe der Erkrankung von anderen lokalen Autoantigenen abgelöst. Milzzellen, bzw. PBMC's von Patienten, zeigen im Laufe der Zeit Reaktivitäten gegenüber anderen Epitopen. Dies können Epitope aus demselben Molekül (*intramolekular*) oder aus einem anderen Molekül (*intermolekular*) (Perry et al., 1991) sein. Werden z.B. SWXJ-Mäuse mit dem Peptid PLP<sub>104-117</sub> immunisiert, so nimmt die systemische Reaktivität gegenüber diesem Epitop innerhalb von 12 Wochen stark ab. Anstelle davon treten Reaktivitäten gegen MBP<sub>87-99</sub> und PLP<sub>139-151</sub> nach ca. 8 Wochen. Nach 12 Wochen kommt noch die Reaktivität gegen PLP<sub>178-191</sub> dazu (Tuohy et al., 1999). Man findet ein determiniertes, sequentielles inter- und intramolekulares Spreading (Yu et al., 1996). EAE und MS treten oft in charakteristischen Schüben auf. Man nimmt an, daß diese Schübe das Entstehen neuer Reaktivitäten widerspiegeln (Tuohy et al., 1999; Yu et al., 1996).



Das Krankheitsbild in MS ist sehr vielfältig und anfangs schwer zu diagnostizieren. Klinische Symptome können sein: Probleme mit der Sehschärfe bis zur Blindheit, Doppelsichtigkeit, motorische Störungen, die das Laufen, sowie die Benutzung der Hände beeinträchtigen, Unkoordiniertheit, Darm- und Blaseninkontinenz, Spastik und Kleinhirntaxie können zur völligen Invalidität führen, sensorische Störungen wie der Verlust an Berührungs-, Schmerz- oder Temperaturempfinden. Typischerweise verläuft die Krankheit in Schüben mit uneinheitlich langen Remissionen dazwischen, die jedoch kürzer werden und zuletzt in einer chronischen progressiven Form enden, in der die Patienten dauernd und fortschreitend invalide sind (Merck, 1993; Steinman, 1996).

Die Tiermodelle verlaufen ähnlich wie MS mit Schüben und Remissionen. Klinische Symptome sind hier jedoch hauptsächlich eine fortschreitende Lähmung, die am Schwanz beginnt, und dann progressiv aufwärts führt. Jedoch auch Blindheit (Linsentrübung), sowie Inkontinenz und eine beeinträchtigte Motorik (vor den Lähmungserscheinungen) kommen vor. Zudem kann ein starker Gewichtsverlust in den Schüben eintreten.

Bisher konnte die Relevanz der autoreaktiven CD4-Zellen in den Plaques für die Entstehung von MS, und damit der autoimmune Charakter der Krankheit, nicht bewiesen werden. EAE und MS haben jedoch histologisch, symptomatisch und immunologisch sehr viele Gemeinsamkeiten, welche die Annahme einer ähnlichen autoimmunen Ätiologie rechtfertigen.

#### **1.4.2 Transgene Mausmodelle für EAE**

In einem normalem T-Zellrepertoire gibt es für jede Peptid-MHC Kombination verschiedene spezifische T-Zellen mit unterschiedlichen TCR's. Die Vorläufer-Zellfrequenz in einem naiven T-Zellrepertoire für einen spezifischen Peptid-MHC-Komplex liegt bei ca. 1 in 100000 (Abbas et al., 2000). Dies macht es schwierig die Reaktionen von T-Zellen einer bestimmten Spezifität auf einen Stimulus hin, in vivo zu untersuchen. Daher wurden mehrere TCR-transgene Mauslinien entwickelt, in denen ein Großteil der T-Zellen spezifisch für ein Myelin-Autoantigen ist.

Vier TCR-transgene Linien mit derselben Spezifität für das N-terminale MBP-Peptid Ac1-10 im Komplex mit I-A<sup>u</sup> wurden unabhängig voneinander entwickelt (Goverman et al., 1993; Lafaille et al., 1994; Liu et al., 1995; Pearson et al., 1997). Trotz derselben Spezifität zeigten die verschiedenen Mauslinien je nach Expressionsstärke unterschiedliche Phänotypen.

Die Linie von Goverman et al. zeigte eine starke Ausrichtung der T-Zellrepertoires zu CD4-positiven Zellen, mit einem reduzierten Anteil an CD8-T Zellen (ca. 3%). Interessanterweise entwickelten diese transgenen Mäuse spontane EAE, wenn sie nicht unter SPF (specific pathogen free)-Bedingungen gehalten wurden, was die Hypothese einer Infektion als Auslöser von MS unterstützte. Der EAE-Verlauf nach Induktion in transgenen war schneller und wesentlich stärker als in nichttransgenen Tieren. Schon durch Pertussistoxin alleine konnte EAE induziert werden (Goverman et al., 1993).

Lafaille et al. kreuzten ihre Linie auf den Rag-ko Hintergrund, in denen durch die fehlende Rekombination keine B-Zellen und nur CD4<sup>+</sup>T-Zellen mit dem transgenen TCR zu finden sind. Diese Mäuse entwickelten zu 100% spontane EAE im Gegensatz zu 14% in transgenen Tieren auf Rag-wildtyp (wt)-Hintergrund. Dies zeigte, daß zum einen EAE ohne Mitwirkung von B-Zellen oder CD8-Zellen entstehen kann, und zum anderen, daß in den Tieren auf

wt-Hintergrund die spontane Entstehung von EAE durch eine andere Zell-Population verhindert wurde (Lafaille et al., 1997; Lafaille et al., 1994).

Die Linien (TCR.Tg3 und TCR.Tg4) von Liu et al. aus dem Labor von David Wraith entwickelten keine spontane EAE. Die aktive EAE-Induktion, insbesondere in der Linie TCR.Tg4 verlief jedoch schwerer als in nichttransgenen Tieren. Liu et al. zeigten mit diesen Linien, daß die natürliche MBP-Sequenz Ac1-9, intraperitoneal injiziert, in TCR.Tg3 nicht zur thymischen Deletion führt. Analoge Peptide mit einer höheren Affinität zu I-A<sup>u</sup>, z.B. Ac1-9(4Y), induzierten dagegen eine starke Deletion der DP-Thymozyten. Zudem wurden Thymozyten der Linie TCR.Tg4, die eine höhere Transgen-Expression hatte, auch von dem niedrigaffinen wt-Peptid deletiert. Dies zeigte einen möglichen Mechanismus, wie autoreaktive T-Zellen der Toleranzinduktion im Thymus entkommen können. Indem das Antigen durch eine zu geringe Affinität zum MHC suboptimal präsentiert wird, liegt die Avidität unter der Schwelle der negativen Selektion (Liu et al., 1995).

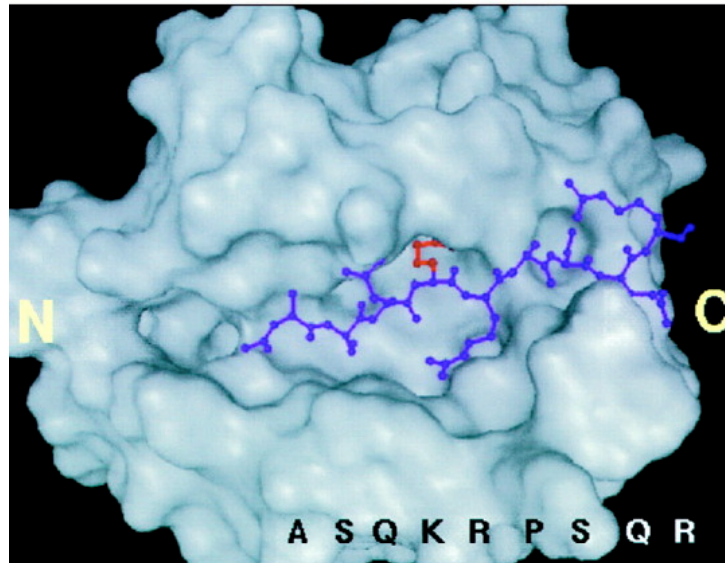
Außer den oben beschriebenen TCR-transgenen Mäusen wurden verschiedene "humanisierte" transgene Linien hergestellt. In Mäusen, die als einziges MHC II Molekül ein chimeres HLA-DR4-IE Molekül exprimierten, konnte EAE mit dem Peptid PLP<sub>175-192</sub> induziert werden (Ito et al., 1996). In einem anderen Modell wurde ein humaner transgener TCR, aus einem MS-Patienten, ein HLA-DR2 Molekül und der humane CD4-Korezeptor eingeführt. Einige dieser Tiere (4%) entwickelten spontane EAE, während Tiere auf dem Rag-ko Hintergrund zu 100% spontane EAE entwickelten. Durch die aktive EAE-Induktion mit dem Peptid MBP<sub>84-102</sub> entwickelten die Tiere MS-ähnliche EAE-Symptome (Madsen et al., 1999).

Transgene Tiere ermöglichten Phänomene zu zeigen, die im normalen T-Zellrepertoire nicht sichtbar sind. Humanisierte, transgene Modelle können näher an der Krankheit im Menschen sein und die damit gewonnenen Daten haben wahrscheinlich eine höhere Relevanz als reine Mausmodelle.

### 1.4.3 Toleranzinduktion in EAE

EAE wurde durch die unterschiedlichsten Methoden beeinflusst, inhibiert oder behandelt. In dieser Arbeit soll die Toleranz gegenüber EAE-Induktion in einem bestimmten System untersucht werden. Daher sollen hier nur Experimente der peripheren Toleranzinduktion und ihre Mechanismen in ähnlichen EAE-Modellen skizziert werden.

Verschiedene Peptidanaloga (Altered peptide ligand: APL) des dominanten MBP-Epitopes Ac1-11 in H-2<sup>u</sup> Tieren haben eine ansteigende Affinität zu I-A<sup>u</sup>: Ac1-11 (4K=wt) < Ac1-11(4A) < Ac1-11(4Y). Molekulare Modelle (Abb. 1.3) und Mutationsstudien von I-A<sup>u</sup> und Ac1-9 (AcASQKRPSQR) zeigten, daß die polare Aminosäure 4K wahrscheinlich in die hydrophobe P6 Tasche von I-A<sup>u</sup> hineinragt (Lee et al., 1998). Die P1-Tasche bleibt frei und die P9-Tasche wird nur oberflächlich von dem Serinrest (8S) ausgefüllt. Die Reste 3Q und 6P sind die Haupt-TCR Kontaktreste (Wraith et al., 1989). Durch große aromatische Reste (Y), die gut in die hydrophobe P6 Tasche passen, kann die Bindung stabilisiert werden. Diese höheraffinen Peptide haben eine deutlich bessere stimulatorische Kapazität für spezifische T-Zellen (Liu et al., 1995), und für das T-Zell Hybridom 1934.4, welches spezifisch für I-A<sup>u</sup> +Ac1-11 ist (Fairchild et al., 1993).



**Abb. 1.3 Strukturmodell von MBP Ac1-9 im Komplex mit I-A<sup>u</sup>.** Modell durch molekulares Modelling (Lee et al., 1998) gewonnen aus der Kristallstruktur von HLA-DR1 und dem Hämagglutinin-Peptid 306-318 (Stern et al., 1994). Das MHC II-Molekül I-A<sup>u</sup> ist in weiß und das MBP-Peptid in blau dargestellt. Die Aminosäuresequenz zu den jeweiligen Resten ist unten gezeigt. Die 4. Aminosäure Lysin, die in die P6-Tasche hineinragt, ist in rot dargestellt. N: Aminoterminus; C: Carboxyterminus.

David Wraith et al. und James Urban et al. zeigten in (PL/J x SJL)<sub>F1</sub> bzw. in B10.PL und PL/J-Mäusen, daß die Co-Immunisierung von solchen APL's, mit erhöhter Affinität zum MHC-Molekül, Ac1-11 (4A) bzw. Ac1-20 (3A,4A), die Induktion von EAE durch das niedrigaffinere wt-Peptid Ac1-11 verhinderte (Urban et al., 1989; Wraith et al., 1989). In späteren Versuchen wurde EAE, induziert durch Ac1-9 oder MBP, durch i.p.- oder i.v.-Injektion dieser Peptide verhindert und sogar behandelt. Dabei korrelierte die Affinität zu I-A<sup>u</sup> positiv mit dem Grad der Inhibition (Liu und Wraith, 1995; Samson und Smilek, 1995).

Ein möglicher Mechanismus der sogenannten "High-Zone-Toleranz" durch lösliche Antigene wurde mittels TCR-transgener Tiere aus dem Labor von Gorman et al. gezeigt. Die passive EAE-Induktion durch den adoptiven Transfer in vitro aktivierter T-Zellen, konnte durch große Mengen i.v.-injizierten MBP (6 x 400µg) oder Ac1-11(K) (6x 1,4 mg) verhindert werden. Dabei zeigte sich, daß die transferierten T-Zellen, wahrscheinlich durch Apoptose (AICD), deletiert wurden (Critchfield et al., 1994).

In TCR-transgenen Mäusen von Pearson et al. wurde die T-Zell-Antwort gegenüber i.v.-injizierten Peptiden Ac1-11(4K,A,Y) (2,4 mg) untersucht. Die Injektion der hochaffinen Peptide induzierte, im Gegensatz zum wt-Peptid, Apoptose und die Sekretion von Th2-Zytokinen nach in vitro-Stimulation (Pearson et al., 1997).

Mit den TCR-transgenen Tieren der Tonegawa-Gruppe (Lafaille et al., 1994) auf wt und Rag-ko Hintergrund wurde Toleranz durch das wt-Peptid Ac1-17 (500µg in IFA, i.p.) induziert. Sowohl die Behandlung 14 Tage vor Immunisierung, als auch beim Beginn der Erkrankung konnte EAE verhindern. Die Toleranzbildung war unabhängig von Fas und IL-4, und auch Deletion konnte nicht beobachtet werden. Die CD4-Zellen wurden durch die Behandlung unempfindlicher gegen Peptidstimulation. Transferiert in Tolerogen-freie Tiere konnten

diese Zellen nach Immunisierung wieder EAE induzieren. Die Toleranzinduktion in diesen Tieren beruhte demnach auf einer reversiblen Form der Anergie und war unabhängig von Deletion, Deviation, Regulation oder inhibitorischen Netzwerken (siehe unten) (Marusic und Tonegawa, 1997).

Barbara Metzler et al. zeigten, daß durch das Peptid Ac1-11 (4Y) in (PL/J x B10.PL)<sub>F1</sub> Tieren zwar keine orale Toleranz, jedoch Toleranz durch Inhalation erzeugt werden konnte. Interessanterweise konnte damit auch EAE, induziert mit Rückenmarkshomogenat, inhibiert werden. Diese Form von EAE wird wahrscheinlich über mehrere Autoantigene erzeugt. Daher war dies ein erster Hinweis auf regulatorische T-Zellen, welche T-Zellen mit einer anderen Spezifität supprimieren können (Metzler und Wraith, 1993). Auch in TCR.Tg4 Mäusen konnte die EAE-Induktion durch intranasale Peptidinhalation (5-14 x 100µg) verhindert werden. Die Inhalation induzierte Apoptose und T-Zellen, die TGF-β und IL-10 produzierten. Die Gabe von anti-IL-10 Antikörpern revertierte den inhibitorischen Effekt der Peptidinhalation (Burkhart et al., 1999).

Chen et al. zeigten direkt die Induktion regulativer Zellen durch orale Gabe von Antigen. T-Zellklone, isoliert aus mesenterischen Lymphknoten von MBP-oral tolerisierten SJL-Mäusen, sekretierten TGF-β und teilweise IL-10 und IL-4. Diese Klone konnten transferiert werden und die Induktion von EAE durch MBP oder PLP verhindern (Chen et al., 1994). Dieses Phänomen, daß die Toleranz gegen ein Autoantigen auch Toleranz gegen ein anderes Autoantigen verursacht, wird "*Bystander-Suppression*" genannt. Es beruht wahrscheinlich darauf, daß regulatorische T-Zellen im Organ oder in den drainierenden Lymphknoten die Aktivierung oder die Effektorfunktion anderer lokaler T-Zellen inhibieren. Auch in TCR-transgenen Tieren konnte die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch eine niedrige Dosis von oral appliziertem MBP (5x 1mg) gezeigt werden. Durch die orale Gabe konnte direkt die Induktion von EAE in TCR-Transgenen inhibiert werden. Wurden Zellen aus diesen tolerisierten Mäusen adoptiv transferiert in (PL/J x SJL)<sub>F1</sub>-Tiere, so wurde in diesen die EAE-Induktion verhindert (Chen et al., 1996). Generell werden bei der oralen Toleranz durch niedrige Antigendosen (*low-zone tolerance*) eher regulatorische Zellen und die Deviation zu einer Th2-Antwort induziert. Bei hohen Antigendosen (*high-zone tolerance*) wird eher Deletion oder Anergie induziert (Weiner, 1997). Die artifizielle Toleranzinduktion durch i.v.-Injektion löslicher Antigene basiert eventuell auf den Mechanismen der oralen Toleranz. Ein möglicher Mechanismus könnte die Antigenaufnahme und -Präsentation durch sinusoidale Leberendothelzellen darstellen. Diese Zellen sind in ständigem Kontakt mit Blut-Lymphozyten und können effizient antigenspezifische T-Zellen in vivo tolerisieren (Limmer et al., 2000).

Die Regulation als Mechanismus der natürlichen Toleranzerhaltung gegenüber Myelinautoantigenen wurde deutlich in TCR-transgenen Tieren auf Rag-ko Hintergrund, die spontane EAE entwickeln (siehe oben). Weitere Experimente zeigten, daß transferierte CD4<sup>+</sup>T-Zellen die spontane EAE in TCR x Rag-ko verhindern können. Auch TCR-transgene Tiere, die auf den TCR-α-ko Hintergrund gekreuzt wurden, bekamen spontan EAE (Olivares-Villagomez et al., 1998; Van de Keere und Tonegawa, 1998). Dies zeigte, daß die Expression endogener TCR-Vα Ketten in TCR-transgenen Tieren die Entwicklung regulatorischer CD4-Zellen ermöglicht. Der dahinterstehende Mechanismus ist jedoch nicht geklärt (Olivares-Villagomez et al., 2000).

Brabb et al. isolierten T-Zellen aus dem Gehirn von TCR-transgenen Tieren und fanden daß der Großteil der Zellen in jungen Tieren (ca. 5 Wochen) einen naiven Phänotyp hat, nicht durch Antigen zu stimulieren ist, und andere naive Lymphknoten T-Zellen supprimiert (Brabb et al., 2000). Daher können zumindest in jungen Tieren auch naive T-Zellen in das ZNS einwandern, wahrscheinlich in situ tolerisiert werden, und später regulatorische Funktionen übernehmen.

Ein weiterer natürlicher Toleranzmechanismus, dessen Relevanz jedoch umstritten ist, stellt die Induktion sogenannter Idiotyp-spezifischer T-Zellen dar (*inhibitorische Netzwerke*). In B10.PL Tieren exprimieren die meisten MBP-reaktiven CD4-Zellen, die spezifisch für Ac1-11 sind, die V $\beta$ 8.2 TCR-Kette. Vipin Kumar und Eli Sercarz zeigten, daß in der Remissionsphase viele CD4-Zellen gegen ein Epitop dieser TCR-V $\beta$ 8.2-Kette induziert werden. Diese Zellen waren meist V $\beta$ 14- oder V $\beta$ 3-positiv. Der adoptive Transfer von Klonen solcher Zellen inhibierte die aktive EAE-Induktion in B10.PL-Mäusen (Kumar und Sercarz, 1993). Die Blockade solcher Zellen durch Antikörper gegen V $\beta$ 3 und V $\beta$ 14 verhinderte die Remission und führte zu einer chronischen Erkrankung (Kumar et al., 1996).

Beim Menschen wurden bisher keine befriedigenden Erfolge mit antigenspezifischer Toleranzinduktion durch APL's (Bielekova et al., 2000; Kappos et al., 2000) oder oraler Gabe von MBP und PLP erreicht (Krause et al., 2000). MS wird jedoch meist mit IFN- $\beta$  behandelt. Der Mechanismus der Wirkung ist nicht aufgeklärt. Versuche mit Mäusen zeigten, daß sowohl EAE als auch das Epitop-Spreading durch IFN- $\beta$  inhibiert werden kann. Proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-12 wurden durch IFN- $\beta$  reduziert, und suppressive Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 aktiviert (Tuohy et al., 2000; Yasuda et al., 1999). Der Mechanismus von IFN- $\beta$  beruht daher eventuell auf Deviation und/oder Regulation.

## 1.5 Schwangerschaft und das Immunsystem

### 1.5.1 Das Paradoxon: Ein immunologischer Fremdkörper wird nicht abgestoßen

In einer normalen Auszuchtpopulation erbt der Fötus unterschiedliche Antigene von der Mutter und vom Vater. Er ist bezüglich zur Mutter *semiallogen*. Vom immunologischen Standpunkt aus ist der Fötus daher für die Mutter ein Fremdkörper, ein semiallogenes Transplantat. Da semiallogene Transplantate, z.B. solche von den eigenen Kindern, abgestoßen werden, ist die Erhaltung der Schwangerschaft in der immunkompetenten Mutter ein Paradoxon. Um dieses Paradoxon zu lösen, müssen sich, während der Entwicklung der Viviparie, ganz spezifische Mechanismen zum Überleben des Fötus, in Gegenwart des mütterlichen Immunsystems, entwickelt haben. Medawar und Billingham, motiviert durch die Erfahrungen mit Transplantationsexperimenten, formulierten als erste die These des immunologischen Paradoxons der Schwangerschaft. Sie stellten vier unterschiedliche, sich gegeneinander nicht ausschließende Hypothesen auf, die dieses Paradoxon möglicherweise erklären sollten: 1. Der Uterus ist ein immunprivilegiertes Organ; 2. Das fötale Gewebe ist nicht immunogen; 3. Der Fötus ist anatomisch von der Mutter getrennt; 4. Die Schwangerschaft verändert die Immunantwort der Mutter (Billingham und Medawar, 1953). Einige der Hypothesen wurden widerlegt und andere teilweise bestätigt:

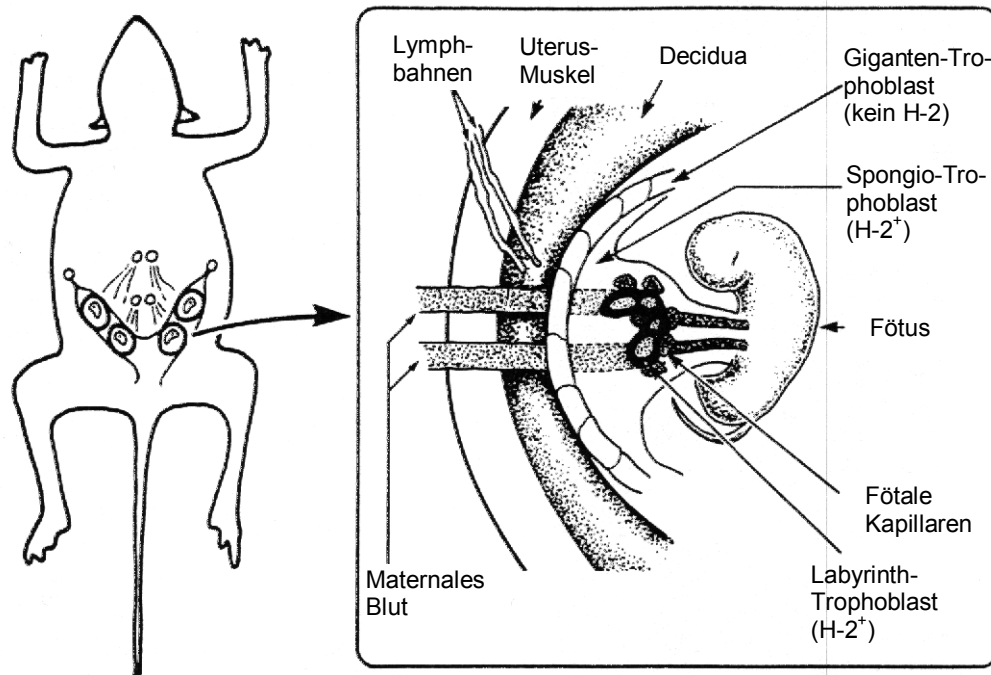
*Der Uterus ist ein immunprivilegiertes Organ.* Diese Hypothese wurde widerlegt. Allogene Organe, transplantiert in den Uterus einer Ratte, wurden abgestoßen egal ob der Uterus von einer nicht schwangeren, einer pseudoschwangeren oder einer schwangeren Ratte stammte. Die Transplantate in den schwangeren Uterus wurden jedoch mit einer leichten Verzögerung von einigen Tagen abgestoßen. Eine vorherige Immunisierung der Tiere konnte die Abstoßung drastisch verschnellern. Außerdem führte die intrauterine Immunisierung mit allogenen Zellen zu einer schnelleren Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten (Beer und Billingham, 1974). Zudem gibt es beim Menschen erfolgreiche extrauterine Schwangerschaften, was verdeutlicht, daß der Uterus als Organ nicht unverzichtbar für die Schwangerschaft ist.

*Das fötale Gewebe ist nicht immunogen.* Diese Hypothese stimmt nur teilweise. In der Maus-Plazenta, die die Grenzfläche zwischen Fötus und Mutter bildet, exprimieren Trophoblastenzellen ab Tag 9 der Embryonalentwicklung, in direktem Kontakt zur Mutter, paternale MHC I Moleküle (Abb. 2) (Chatterjee-Hasrouni und Lala, 1982; Hedley et al., 1989).

Beim Menschen werden in der Plazenta, im Kontakt zum mütterlichen Gewebe, nur die nichtklassischen MHC I-Moleküle HLA-G und -E und eventuell das klassische MHC I-Molekül HLA-C exprimiert (Braud et al., 1999; King et al., 1996). Die nicht klassischen MHC Ib-Moleküle HLA-E (Qa-1 in der Maus) und HLA-G sind nicht polymorph, binden  $\beta_2m$  und werden im MHC kodiert. HLA-E ist ubiquitär exprimiert und präsentiert, abhängig von TAP, Peptide, die aus der Signalsequenz anderer, klassischer MHC I Moleküle sowie dem nicht-klassischen HLA-G stammen (Braud et al., 1997). Da es die eigene Signalsequenz nicht bindet und sehr spezifisch für die MHC I Signalsequenzen ist, wird es in Zellen ohne MHC I-Expression nicht an der Oberfläche exprimiert. HLA-E wird von dem inhibitorischem NK-Zellrezeptor CD94/NKG2A auf NK-Zellen erkannt, und inhibiert damit die Lyse der HLA-E positiven Zelle durch NK-Zellen (Allan et al., 1999). Das HLA-E Molekül stellt somit ein ideales System dar, um NK-Zellen den Zustand der Expression klassischer MHC I Moleküle zu signalisieren (Lanier, 1998). Im Gegensatz zu HLA-E ist HLA-G bisher nur beim Menschen charakterisiert worden, und hat ein sehr restringiertes Expressionsmuster. Es wird nur von Thymus-Epithelzellen und auf fötalen Zellen der Plazenta exprimiert. HLA-G präsentiert TAP-abhängig Peptide und wird von den Rezeptoren ILT2 und ILT4 erkannt, die auf Monozyten bzw. NK-Zellen und T-Zellen exprimiert werden (Braud et al., 1999). Da im Menschen auf fötalen Trophoblasten der Plazenta vor allem HLA-G und HLA-E exprimiert werden, nimmt man an, daß die beiden Moleküle die Toleranz gegenüber maternalen NK-Zellen der Decidua vermitteln. Ca. 70% der hämatopoetischen Zellen in der Decidua sind große granuläre NK-Zellen (LGL). Diese sind  $CD3^+CD16^+CD56^+$  und können nach IL-2 Stimulation Trophoblasten lysieren (Johnson et al., 1997; King et al., 1997). Die Expression von HLA-G scheint jedoch nicht essentiell für das Überleben des Fötus zu sein, da Individuen identifiziert wurden, die homozygot für ein HLA-G-Null Allel sind (Ober et al., 1998).

MHC Klasse II wird weder beim Mensch noch in der Maus in der Plazenta von Trophoblasten exprimiert (Chatterjee-Hasrouni und Lala, 1981). MHC II wird nur von Makrophagen der Plazenta und Endothelzellen der Chorion-Villi exprimiert (Natali et al., 1981; Wood, 1994).

Die Plazenta ist demnach nur in frühen Stadien nicht immunogen. Die fehlende MHC II-Expression auf Trophoblasten könnte in der Maus ein wichtiger Schutzmechanismus darstellen, da die experimentelle Induktion von MHC II auf Spongiotrophoblasten und Labyrinth-Trophoblasten zum Abort führt, der durch Antikörper gegen MHC II verhindert werden kann (Chaouat, 1993).



**Abb. 2: Schematischer Aufbau der murinen fetoplazentalen Einheit.** Nach (Clark et al., 1984). Die Decidua bildet den maternalen Teil der Plazenta, die in direktem Kontakt zum Giganten-Trophoblast des Fötus steht. Der Giganten-Trophoblast degeneriert im Laufe der Schwangerschaft, so daß maternales Gewebe und Blut in direkten Kontakt zum Spongiotrophoblast kommt.

Daß diese abgeschwächte Antigenität jedoch nicht hauptsächlich für das Überleben des Fötus verantwortlich ist, wird deutlich in Experimenten, in denen spezifische Toleranzmechanismen der Plazenta gebrochen wurde (siehe unten) und dies zu einer starken Antigen- und T-Zell-spezifischen Immunantwort gegen das fötale Gewebe und damit zum Abort führte (Munn et al., 1998). Auch in der normalen Schwangerschaft wird die Immunogenität des Fötus deutlich in Form von anti-paternalen Antikörpern oder der Hypertrophie der Uterus-drainierenden para-aortischen Lymphknoten, spezifisch in Schwangerschaften mit allogenen Föten (Beer und Billingham, 1974). Daß die Antigene des Fötus weder anatomisch getrennt von der Mutter sind, noch daß sie zu wenig immunogen sind, wird auch deutlich in Experimenten mit TCR-transgenen Mäusen, die eine Toleranzinduktion in der Schwangerschaft spezifisch gegen paternale Antigene zeigten (Tafari et al., 1995) (siehe unten).

*Der Fötus ist anatomisch von der Mutter getrennt.* Die These, die Plazenta könnte eine Art *physikalische Barriere* für das Immunsystem darstellen wurde verworfen. Nagetiere und Primaten haben eine hemochoriale Plazenta, in denen die maternalen und fötalen Gewebe nicht durch eine Basalmembran voneinander getrennt sind. Die invasiven Trophoblasten bewirken sogar den Bruch von Uterus-Gefäßen, was zum direkten Kontakt zwischen mütter-

lichem Blut und fötalen Trophoblasten führt (Cross et al., 1994). In der Schwangerschaft werden fötale Zellen in der Zirkulation gefunden (Bonney und Matzinger, 1997; Herzenberg et al., 1979). Maternale Zellen migrieren in den Fötus und können dort unter Umständen sogar zu postnatalen Graft-versus-Host Reaktionen führen (Beer und Billingham, 1973). Trotzdem ist die Sicht der Plazenta als eine *immunologische Barriere* nicht falsch. Die aktive Abwehr von Fötus-reaktiven T-Zellen durch die Plazenta stellt eventuell den wichtigsten immunologischen Mechanismus zum Überleben des Fötus dar (siehe unten).

*Die Schwangerschaft verändert die Immunantwort der Mutter.* Diese Hypothese ist auch nur teilweise richtig. Eine systemische Antigen-unspezifische Immunsuppression findet kaum statt. Die schwangere Mutter zeigt eine normale Immunantwort gegen die meisten Pathogene und höchstens eine leicht verzögerte Transplantatabstoßung (Jacoby et al., 1984). Daß das maternale Immunsystem jedoch antigenspezifisch durch den Fötus supprimiert werden kann, ist sowohl für B-, als auch für T-Zellen demonstriert worden (siehe unten).

Die Schwangerschaft wird oft in Verbindung mit einer dominanten Th2-Immunantwort gebracht. So sind zum Beispiel die anti-paternalen Alloantikörper in der Schwangerschaft nicht-Komplement-fixierende IgG1-Antikörper, welche in Th2-Immunantworten gebildet werden (Bell und Billington, 1980). In der Tat kann die Injektion oder die experimentelle Induktion der Th1-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 zum Abort führen (Chaouat et al., 1990; Krishnan et al., 1996b). In Mäusen schwächt die Deviation zur Th2-Antwort während der Schwangerschaft die Resistenz von C57BL/6-Mäusen gegen *Leishmania major* (Krishnan et al., 1996a).

### 1.5.2 Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft

Obwohl keine der von Medawar postulierten Hypothesen als solche bis heute Bestand hatte, waren einige davon teilweise richtig oder werden heute in abgewandelter Form für das Überleben des Fötus verantwortlich gemacht. Dies sind ein immunsuppressives Milieu in der Plazenta mit einhergehender Induktion einer Th2-Deviation, die aktive Inhibition von anti-fötalen T-Zellen in der Plazenta durch Tryptophan-Entzug, und eventuell die antigenspezifische Toleranzinduktion während der Schwangerschaft.

Viele Faktoren, die vom Fötus oder der Plazenta isoliert wurden, wurden in vitro als immunsuppressiv beschrieben. Die meisten wie z.B. HCG (human chorionic Gonadotropin) oder alpha-fetoprotein verloren jedoch nach gründlicher Aufreinigung ihre suppressive Aktivität. Die Hormone Progesteron, Prostaglandin E2 und Östrogen wirken in vitro immunsuppressiv und/oder induzieren eine Th2-Differenzierung. Zudem werden die typischen Th2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-5 in der Decidua (Lin et al., 1993) und von Trophoblastenzellen (IL-10) (Roth et al., 1996) sekretiert. Ein weiteres immunmodulatorisches Zytokin, das früh in der Schwangerschaft von Trophoblasten synthetisiert wird, ist IFN- $\tau$  (tau).

Zwei Beispiele verdeutlichen die Relevanz von Immundeviation während der Schwangerschaft: 1. In Verpaarungen von CBA-Weibchen mit DBA/2-Männchen kommt es zu einer hohen Rate spontaner Aborte. Zwischen 25 und 50% der Embryos werden um Tag 12 der Schwangerschaft resorbiert. Dafür werden NK-Zellen und aktivierte Makrophagen verantwortlich gemacht. Die Plazenta in solchen Verpaarungen ist defizient an IL4 und IL-10. Re-



kombinantes IL-10 verhindert die spontanen Aborte völlig (Chaouat et al., 1995). 2. Die Injektion oder Induktion von IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder LPS führt während der Schwangerschaft zum Abort (Chaouat, 1993; Raghupathy, 1997).

Auch die Expression von FasL in der Plazenta und im Uterus wurde als wichtiger Mechanismus der Toleranzerhaltung gegenüber dem Fötus vorgeschlagen (Hunt et al., 1997). Die erfolgreiche Schwangerschaft in FasL defizienten Tieren, die entweder gegen paternale Antigene immunisiert wurden, oder in denen ein transgenes MHC I-Molekül spezifisch auf Trophoblastenzellen exprimiert wurde, schließt jedoch eine essentielle Rolle für die FasL/Fas induzierte Apoptose in der Toleranz gegenüber dem Fötus aus. (Chaouat et al., 1999; Rogers et al., 1998).

Die antigen-spezifische Immunsuppression von T-Zellen während der Schwangerschaft wurde in unserem Labor von Tafuri et al. in einem TCR-transgenen System demonstriert. Wurden Des-TCR Weibchen (transgener anti H-2K<sup>b</sup>-TCR) mit C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) Männchen verpaart, so führte dies zu einer relativen Reduktion von Des<sup>+</sup>T-Zellen und zur Herunterregulation des CD8-Korezeptors. In syngen oder allogenen Verpaarungen mit H-2<sup>S</sup>-Mäusen war dies nicht der Fall. Die Verpaarung mit C57BL/6 führte in vivo zur Toleranz der Tiere gegenüber K<sup>b</sup> exprimierenden Tumorzellen. Sowohl die Reduktion, als auch die phänotypischen Veränderungen der T-Zellen und die Toleranz gegenüber den Tumorzellen waren transient und auf die Zeit der Schwangerschaft begrenzt (Tafuri et al., 1995). Der Mechanismus und die Relevanz dieser antigenspezifischen Tolerisierung sind jedoch nicht geklärt. Die Toleranzinduktion könnte auch eine Art Nebeneffekt der Schwangerschaft sein und nicht hauptsächlich das Überleben des Fötus verursachen. Auch in einem anderen TCR-transgenen System wurde die antigenspezifische Toleranzinduktion in der Schwangerschaft gezeigt. Clonotyp positive D<sup>b</sup>, restringierte CD8<sup>+</sup>T-Zellen von anti-H-Y TCR-transgenen Weibchen wurden spezifisch in Verpaarungen mit H-2<sup>b</sup> positiven Männchen deletiert und wurden in vitro anerg gegen Stimulation (Jiang und Vacchio, 1998). Die Relevanz dieser Anergie in vivo wurde jedoch nicht gezeigt.

Auch für B-Zellen wurde in einem BCR-transgenen System die antigen-spezifische Deletion gezeigt. B-Zellen, die einen transgenen BCR tragen, der spezifisch gegen K<sup>k</sup> ist, wurden in Schwangerschaften mit H-2<sup>k</sup>-positiven Föten zu 80% im Knochenmark und in der Milz deletiert. Da die Deletion von naiven B-Zellen normal nicht durch lösliche Antigene (z.B. H-2) induziert wird, weist dies auf eine aktive Toleranzinduktion durch fötale Zellen in den lymphoiden Organen der Mutter hin (Ait-Azzouzene et al., 1998).

Der bisher am eindeutigsten definierte Mechanismus zur Erhaltung einer allogenen Schwangerschaft, ist die Inhibition von T-Zellen durch den Entzug von Tryptophan in der Plazenta. Das Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) katalysiert den ersten Schritt der Tryptophandegradation (Trp→N-Formylkynurenine). IDO wird in manchen Makrophagen nach Stimulation durch IFN- $\gamma$  exprimiert. Dies führt zur schnellen Degradation von Tryptophan und dadurch zu einem Zellzyklusblock in benachbarten T-Zellen, der erst durch Tryptophanzugabe und einer erneuten TCR-Stimulation wieder aufgehoben werden kann (Munn et al., 1999). IDO wird in der humanen Plazenta von Syncytiotrophoblasten (Giganten-Zellen)

(Kamimura et al., 1991) und im Maus-Fötus ab Tag 9,5 exprimiert (Ab Tag 10,5 nur in der Plazenta) (Munn et al., 1998). Beim Menschen wird während der Schwangerschaft eine systemische Reduktion des Tryptophanspiegels im Plasma gefunden (Schrocksnadel et al., 1996). Um zu testen, ob IDO eventuell die Toleranz gegenüber dem allogenen Fötus verursacht, behandelten Munn et al. syngen und allogen verpaarte, schwangere Mäuse ab Tag 4,5 mit einem IDO-Inhibitor, 1-Methyl-Tryptophan. In allen allogen Verpaarungen führte die Behandlung ab Tag 8 zu einer progressiven Entzündung und Infiltration von Monozyten mit nachfolgender Degeneration der Föten. In syngen Verpaarungen kam es zu keiner Entzündung und zu normalen Würfen. Auch die Schwangerschaft mit Föten, die nur ein allogenes MHC I-Transgen auf Trophoblasten exprimierten, führte zum Abort (Munn et al., 1998). Spätere Untersuchungen definierten eindeutig die Rolle von CD8-T Zellen in dieser Abstoßungsreaktion: Wurden TCR-transgene BM3-Weibchen (CD8, anti K<sup>b</sup>) auf Rag-ko Hintergrund mit CBK Männchen (transgene Mäuse auf CBA Hintergrund mit K<sup>b</sup>-Transgen) verpaart, führte dies zu einer starken Entzündung, Komplementablagerung und Infiltration von T-Zellen. Da diese Mäusen keine B-Zellen haben, mußte das Komplement durch den alternativen Weg entweder direkt über T-Zellen oder indirekt über Makrophagen aktiviert worden sein. Auch Föten, die nur Minor-Alloantigene (genetischer nicht-MHC Hintergrund) trugen, wurden, je nach genetischer Distanz, von der Mutter abgestoßen (Mellor et al., 2001).

Diese Daten zeigen, daß der Fötus, wenn die Tryptophanblockade aufgebrochen ist, wie ein normales Transplantat abgestoßen wird. Da die anderen besprochenen Formen der Toleranzinduktion wie Deviation oder Anergie nach IDO-Inhibition anscheinend keinen Schutz mehr für den Fötus bieten, sind diese entweder untergeordnete Mechanismen, oder eventuell abhängig von der IDO-Expression, bzw. werden durch die IDO-Inhibition aufgehoben.

### 1.5.3 Autoimmunität in der Schwangerschaft

Autoimmunkrankheiten haben einen sehr unterschiedlichen Verlauf während der Schwangerschaft. Die Antikörper-basierenden Autoimmunkrankheiten verschlimmern sich oft während der Schwangerschaft. Die eher T-Zell basierenden Erkrankungen werden oftmals in der Schwangerschaft zunehmend besser, gefolgt von Exazerbationen nach der Geburt.

SLE und insbesondere die Glomeronephritis als eine typische Antikörper vermittelte Autoimmunkrankheit tendiert eher zur Verschlimmerung in der Schwangerschaft. Der negative Einfluß von weiblichen Hormonen auf die Krankheit und auf das Mausmodell wurde bereits oben besprochen. Generell wird angenommen, daß die erhöhten Östrogenwerte und die Deviation zur humoralen Th2-Immunantwort in der Schwangerschaft zur Verschlimmerung der Krankheit beitragen (Wilder, 1995).

Die Autoimmunkrankheit mit dem deutlichsten Schwangerschaftseffekt ist Rheumatoide Arthritis (RA). Bei ca. 70-80% der Patienten verbessert sich die Krankheit während der Schwangerschaft. Jedoch verschlechtert sich bei ca. 90%, in denen Remissionen in der Schwangerschaft eingetreten sind, der Zustand nach der Geburt wieder. Diese Verschlechterung tritt bei 65% in den ersten 8 Wochen nach der Geburt ein (Floyd und Roberts, 1992; Shoenfeld und Isenberg, 1989). Auch in zwei Mausmodellen, der Proteoglykan- und der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), bewirkt die Schwangerschaft Remissionen mit starken Exazerbationen nach der Geburt. Findet in der CIA die Schwangerschaft jedoch vor dem

Beginn der Erkrankung, die ca. 70 Tage nach Induktion beginnt, statt, so verfrüht sich der Beginn um bis zu ca. 40 Tage durch die Exazerbation nach der Schwangerschaft (Buzas et al., 1993; Waites und Whyte, 1987). Während der Schwangerschaft hat die Mutter erhöhte Kortikosteroid-, Progesteron- und Östrogen-Konzentrationen im Plasma. Nach der Geburt findet ein starker Abfall dieser Hormone unter den Normalwert statt (Wilder, 1995). Wird in CIA nach der Geburt der Östrogenspiegel künstlich hoch gehalten, so können die Exazerbationen völlig unterdrückt werden (Mattsson et al., 1991).

In einer Untersuchung wurde die Remission in RA mit der Disparität der MHC II Moleküle korreliert. Als Mechanismus wurden kreuzreaktive anti-MHC II Antikörper vorgeschlagen (Nelson et al., 1992; Nelson et al., 1993). Solche aus Plazenta isolierten Antikörper gegen paternales MHC II zeigten eine positive Wirkung auf RA-Patienten (Moynier et al., 1987).

Bei MS ist der Effekt der Schwangerschaft nicht so eindeutig wie in RA. In einer größeren Untersuchung wurde jedoch gefunden, dass die Relaps-Rate von normalerweise 0,28 (pro Patient pro Jahr) in der Schwangerschaft sukzessive auf 0,04 bis zum Ende der Schwangerschaft sinkt, und in den ersten drei Monaten nach der Geburt auf 0,82 ansteigt (Korn-Lubetzki et al., 1984). Obwohl die Daten hier nicht so eindeutig wie bei RA sind, ist auf jeden Fall dieselbe Tendenz zu erkennen (Abramsky, 1994; Birk et al., 1988). Auch für EAE wurde in Ratten, Meerschweinchen (Keith, 1978) und Kaninchen (Evron et al., 1984) ein inhibitorischer Effekt der Schwangerschaft gefunden. Eine andere Studie zeigte jedoch in Auszucht-Ratten nur einen sehr geringen verzögernden Effekt von ca. 2 Tagen der Schwangerschaft auf die EAE-Induktion (Brenner et al., 1991). In dieser Studie wurde sowohl der Effekt der Schwangerschaft auf EAE, als auch die Auswirkungen der EAE-Induktion auf die Schwangerschaft in Kaninchen und Ratten untersucht. In Kaninchen verzögerte die Schwangerschaft den Beginn von EAE, induziert vor oder während der Schwangerschaft, um durchschnittlich 40 Tage. Bei ca. 70% der Kaninchen führte die EAE-Induktion zum Abort der Schwangerschaft. Bei Ratten führte nur die EAE-Induktion in der ersten Hälfte der Schwangerschaft bei ca. 30% zum Abort. In schwangeren Kaninchen war der Beginn von EAE immer verzögert bis zum Abort, oder bis nach der Geburt. Die Daten bei den Kaninchen weisen auf eine gegenseitige Inhibition zwischen Schwangerschaft und EAE hin.

Für verschiedene Faktoren, die in der Schwangerschaft vermehrt in den mütterlichen Kreislauf gelangen, wurde gezeigt, daß diese die EAE-Induktion inhibieren oder verzögern können. Alpha-Fetoprotein (AFP) (mit der Einschränkung, daß daran wahrscheinlich andere immunsuppressive Faktoren wie TGF- $\beta$  oder Hormone gebunden waren) konnte EAE inhibieren (Abramsky et al., 1982). Für Östrogen wurde wie für RA ein sehr stark verzögernder Effekt auf den Beginn von EAE von ca. 35 Tagen gezeigt (Jansson et al., 1994). In einem passiv induzierten EAE-Modell führte die Östrogenbehandlung zur dominanten Th2-Antwort der MBP-spezifische T-Zellen. Die Behandlung mit Progesteron hatte dagegen keinen Effekt (Kim et al., 1999). Das Typ I Interferon Tau (IFN- $\tau$ ), wird von Trophoblastenzellen produziert, und hat ähnliche Wirkungen wie IFN- $\beta$ . Die mehrmalige Injektion von IFN- $\tau$  kann die EAE-Induktion wirksam inhibieren (Soos et al., 1995). IFN- $\tau$  induziert die Bildung von regulatorischen T-Zellen, die IL-10 und TGF- $\beta$  sekretieren (Mujtaba et al., 1997). Ein weiterer Faktor, der EAE inhibiert, ist der sogenannte "Early pregnancy factor" (EPF), ein extrazelluläres Hitzeschockprotein, das verwandt mit Chaperonin 10 ist (Zhang et al., 2000) und früh vom Em-

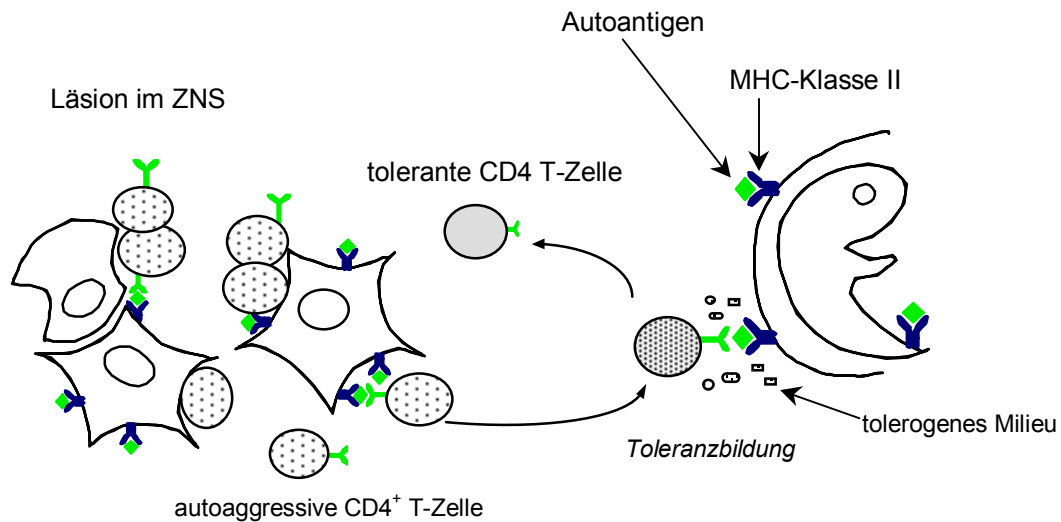
bryo exprimiert wird. Jedoch auch bei diesem Faktor ist die Identität des wirksamen Proteins umstritten (Kawamura et al., 2000).

Die Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zur antigenspezifischen Toleranz-Induktion gegen paternale Antigene (siehe oben) zeigten, daß T-Zellen während der Schwangerschaft eine transiente Toleranz gegen paternale Antigene ausbilden. Mehrere Tage nach der Schwangerschaft war die Toleranz wieder verloren. Diese zeitliche Korrelation der Toleranz mit der Schwangerschaft ist dem Phänomen der Remission von Autoimmunkrankheiten während der Schwangerschaft und der nachfolgenden Exazerbation sehr ähnlich. Daher wäre eine mögliche Erklärung der Remissionen, daß die Expression von Autoantigenen durch den Fötus zur transienten Toleranz von autoreaktiven T-Zellen in der Mutter führt (Tafari et al., 1995).

Das bedeutet, daß nicht nur Antigen-unspezifische, suppressive Faktoren, sondern auch antigenspezifische Toleranzmechanismen in den Remissionen eine Rolle spielen könnten. Diese Hypothese stellt keine Alternative zu den gefundenen suppressiven Faktoren dar. Diese Faktoren könnten parallel dazu wirken und/oder das tolerogene Milieu für die Toleranzbildung der autoreaktiven T-Zellen formen.

## 2. Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, ein System aufzubauen mit dem die Hypothese getestet werden kann, daß die fötale Expression eines Autoantigens die Autoimmunerkrankung der Mutter positiv beeinflussen kann (Abb. 3).



**Abb. 3: Schema zur Toleranzbildung während der Schwangerschaft.** Schematische Darstellung der Hypothese zur Toleranzbildung gegenüber maternalen Autoantigenen in der Schwangerschaft. Als Beispiel ist hier MS oder EAE gewählt. Gezeigt sind Autoantigen-spezifische CD4-T-Zellen, die im ZNS den Autoimmunschaden hervorrufen und während der Schwangerschaft durch fötal exprimiertes Autoantigen toleriert werden. Dies trägt zur spezifischen transienten Linderung der Krankheitssymptome in der Schwangerschaft bei.

Als Autoimmunerkrankung wurde dazu EAE als Mausmodell für MS ausgewählt. Dies geschah aus folgenden Gründen: 1. MS ist ein typisches Beispiel für eine Autoimmunerkrankung mit Remissionen in der Schwangerschaft. 2. EAE ist ein sehr gut charakterisiertes Modell mit mehreren bekannten Autoantigenen und definierten Effektorzellen. 3. EAE läßt sich experimentell einfach und zuverlässig induzieren und klinisch leicht klassifizieren. 4. Es existieren mehrere T-Zellrezeptor transgene Mauslinien, mit Spezifität für ein autoantigenes Epitop von MBP. 5. Die Induktion von EAE ist relativ schnell, insbesondere mit TCR-transgenen Tieren beginnt die Erkrankung bereits am Tag 8-10 nach Immunisierung. Dies macht eine Induktion der Erkrankung während der 3-wöchigen Schwangerschaft möglich.

Zur Beantwortung der obigen Hypothese sollte ein transgenes Maussystem aufgebaut werden, in dem der Fötus das Autoantigen dominant präsentiert, während bei der Mutter in der Schwangerschaft EAE induziert wird. Dazu sollten Männchen einer transgenen Mauslinie, die das Autoantigen dominant präsentiert, mit Weibchen verpaart werden, in denen mit diesem Autoantigen EAE induziert werden kann. Eine verzögerte oder abgeschwächte Erkrankung in der Schwangerschaft mit transgenen Männchen im Vergleich zu nichttransgenen würde diese Hypothese bestätigen.

Für die zuverlässige Präsentation des Autoantigens wurde ein System gewählt, das schon vorher in einigen transgenen Mausmodellen benutzt worden war (Fukui et al., 1997; Ignatowicz et al., 1996a). Hierbei ist das autoantigene Peptid kovalent über einen Glycin-Linker an den Aminoterminal der  $\beta$ -Kette des MHC Klasse II Moleküls gebunden. Dies ermöglicht eine ca. 30% Beladung des MHC-Moleküls mit dem kovalent gebundenen Autoantigen. In Mäusen auf dem Invariante Kette Knockout-Hintergrund wird das kovalent gebundene Peptid nicht durch andere Peptide ersetzt, daher ist dort das MHC Klasse II Molekül nahezu 100% mit dem kovalenten Peptid beladen (Fukui et al., 1997; Ignatowicz et al., 1996a; Ignatowicz et al., 1996b; Ignatowicz et al., 1995). Da in diesem System das autoantigene Peptid zwar dominant, jedoch im natürlichen Kontext präsentiert werden sollte, wurde ein MHC Klasse II Promotor zur Expression des Peptid-MHC Konstruktes verwendet.

Das transgene Mausmodell sollte aufgebaut und charakterisiert werden, und daraufhin in Schwangerschaftsexperimenten eingesetzt werden.

## 3. Material

### 3.1 Bezugsquellen

**Chemikalien:** Es wurden Chemikalien und Grundsubstanzen von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), und Roth (Karlsruhe) bezogen. Nukleotide für die PCR wurden von Hybaid-AGS (Heidelberg) bezogen.

**Enzyme:** Der weitaus überwiegende Teil der Restriktionsenzyme und anderer DNA/RNA modifizierender Enzyme wie T4 DNA-Ligase, CIP (calf intestine phosphatase), Klenow-Enzym, T4-DNA-Polymerase, DNase, RNase A, Reverse Transkriptase wurde von der Firma MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen. Taq/Pwo-DNA-Polymerase-Mixtur (Proofsprinter) wurde von Hybaid-AGS (Heidelberg) bezogen. Vereinzelt wurden Enzyme der Firmen Roche (Mannheim), Promega (Mannheim), New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Amsterdam, Niederlande) und Gibco BRL (Eggenstein) verwendet.

**Gebrauchswaren:** Die Plastikartikel für die Zellkultur und die molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Greiner (Frickenhäusen), Falcon (Becton Dickinson), Nalgene, Nunc, und Renner (Darmstadt) bezogen.

### 3.2 Verwendete Kits

DNA-Maxi Kit (Quiagen)	Aufreinigung von Bakterieller Plasmid-DNA
DNA Labelling and Detection Kit-Nonradioactive (Boehringer)	Digoxigenin-Markierung von DNA zur Verwendung als Sonde zur Hybridisierung
Qiaquick Gel Extraction Kit (Quiagen)	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen über Säulchen
RNeasy Total RNA Kit (Qiagen)	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebekomogenisaten über Säulen
Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)	PCR-Reaktionen bis zu 5 kb mit geringer Fehlerrate durch proofreading-Aktivität einer beigemengten Pwo-Polymerase

### 3.3 Geräte

Brutschrank 3029	Forma Scientific
Elektrophoresekammern Easy Cast	MWG Biotech GmbH (Ebersberg)
Eismaschine Wessamat	Zugck (Leimen)
FACScan	Becton Dickinson
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter	Messer Griesheim (Düsseldorf)
Gewebekomogenisator PolytronPT 2100	Kinematica
Kaltlichtlampe KL 1500-Z	Schott (Göttingen)
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr; Bosch
Lumi-Imager	Boehringer Mannheim

Magnetrührer, Heizplatte MR 3002	Heidolph
Mikroskop	Olympus
PCR-Block Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research Inc. (Watertown, USA)
pH-Meter 761 Calimetric	Knick
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Schüttelinkubator Incubator Shaker 6725	New Brunswick Scientific GmbH
(Schüttel-)Wasserbad	Köttermann (Hänigsen)
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik; Janke+Kunkel
Spannungsgeräte Biometra P25	Biotron (Göttingen)
Stereolupe	Leitz
Sterilbank Biogard Hood	Baker Company Inc. (Maine, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
Ultraschallgerät Sonofier 250	Branson (Connecticut, USA)
Vakuuofen	Heraeus (Osterode)
Videografikdrucker UP 890CE	Hitachi
Waagen	Satorius (Göttingen); Mettler
Zentrifuge Minifuge 2	Heraeus Christ (Osterode)
Zentrifuge Omnifuge 2,0 S	Heraeus Sepatech (Osterode)
Zentrifuge TJ-6	Beckmann (Palo Alto, CA, USA)
Zentrifuge Sorvall RC5C Plus	Kendro

### 3.4 Puffer, Lösungen und Reagentien

In der Regel wurden die Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Für die Elektrophoresepuffer genügte einfach deionisiertes Wasser. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt werden, ist der Konzentrationsfaktor in Klammern angegeben. Lösungen, die feucht autoklaviert werden (121°C, 25 min), sind mit \* gekennzeichnet. Die Prozentangaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf Gewicht pro Volumeneinheit (w/v).

BCIP-Lösung :	50 µg/ml in 70 % DMF/H <sub>2</sub> O
CIP-Puffer (10x) (-20°C):	100 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM MgCl <sub>2</sub>
Denaturierungslösung :	0.5 M NaOH; 1 M NaCl
Denhardt's*:	1% Ficoll; 1% BSA; 1% Polyvinylpyrrolidon filtrieren und zu 25 ml Aliquots bei -20°C lagern
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% DEPC in H <sub>2</sub> O (37°C ÜN, dann autoklavieren)
dNTP-Mix (PCR) (-20°C):	10 mM dATP; 10 mM dTTP; 10 mM dCTP; 10 mM dGTP; in ddH <sub>2</sub> O
DPBS	(Dulbecco's modified PBS) : 8g/l NaCl; 200mg/l KCl; 100 mg/l MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O; 100mg/l CaCl <sub>2</sub> ; 1,47 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O; 200mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,2



Dynabeads	DYNAL (Oslo, Norwegen)
FACS-Puffer	3% FCS; 0,45 % Glucose; 0,01% $\text{NaN}_3$ ; in DPBS
Ziege anti Maus IgG (H+L)	(Paesel & Lorei, Duisburg)
Gekoppelt an magnetische Partikel	
Heparin	(Ratiopharm, Uppsala, Schweden), 25.000 I.E. in 5ml
Hybridisierungslsg.:	1% Blockierungsreagenz (Boehringer) in Prä-Hybridisierungslsg.
KaAc/HCOOH-Puffer ( $4^0\text{C}$ ):	3 M KaAc; 5% HCOOH
Ladepuffer ( $-20^0\text{C}$ ) :	0.1% Bromphenolblau; 0.1% Xylen Cyanol FF; 15% Glycerol
Ligationspuffer (10x):	500 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM $\text{MgCl}_2$ ; 20 mM DTT; 20 mM Spermidin
Lysepuffer (Maxi):	200 mM NaOH; 1% SDS
Lymphoprep	(Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen)
Neutralisierungslösung (SB):	0.5 M Tris/HCl pH 7.4; 3 M NaCl
NaOH/SDS-Puffer :	200 mM NaOH; 1% SDS
NBT-Lösung:	75 mg/ml in DMF
PBS (10x)*:	1.3 M NaCl; 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ mit 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ auf pH7.0 eingestellt
Pertussistoxin	(CALBIOCHEM) Stocklösung: 40 $\mu\text{g}$ /ml in 100mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 500mM NaCl; pH7,0
Prä-Hybridisierungslösung:	5x Denhardt's; 4x SSPE; 1% SDS; 100 $\mu\text{g}$ /ml Heringssperma-DNA
Prälyse-Puffer (Maxi) :	50mM Glukose; 25mM TrisHCl (pH 8,0); 10mM EDTA
10 x Proofsprinter-Puffer (Incomplete)	500mM Tris/HCl pH 9,1; 140mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Puffer-1 (SB):	100 mM Tris/HCl pH 7.5; 150 mM NaCl
Puffer-2 (SB):	2% Blockierungsreagenz (Boehringer) in Puffer-1
Puffer-3 (SB):	100 mM Tris/HCl (pH 9.5); 100 mM NaCl; 50 mM $\text{MgCl}_2$
Rf 1 :	100 mM RbCl; 50 mM $\text{MnCl}_2$ ; 30 mM KaAc; 10 mM $\text{CaCl}_2$ ; 15% Glyzerin
RF 2 :	10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM $\text{CaCl}_2$ ; 15% Glycerin
RNase A	10 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}$
SSC (20x) :	3 M NaCl; 0.3 M Natriumcitrat pH 7.0
SSPE (20x) :	3.6 M NaCl; 200 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 20 mM EDTA; mit NaOH pH auf 7.0
TAE (10x) :	400 mM Tris/HAc pH 7.4; 50 mM NaAc; 10 mM EDTA
Tail-Puffer	100 mM Tris; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl;

	0,2 % SDS; pH 8,5
TE (10x) :	100 mM Tris/HCl pH 8.0; 100 mM EDTA
Trypanblau-Färbelösung:	0,16% (g/v) Trypanblau, 150mM NaCl
Waschlösung (SB):	0.5 x SSC; 0.1% SDS
Restriktionspuffer (Fermentas ):	
B <sup>+</sup> (10x) :	100 mM Tris/HCl (pH 7.5); 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1mg/ml BSA
G (10x) :	100 mM Tris/HCl (pH 7.5); 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 500mM NaCl, 1mg/ml BSA
O <sup>+</sup> (10x) :	500 mM Tris/HCl (pH 7.5); 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1M NaCl, 1mg/ml BSA
R (10x) :	100 mM Tris/HCl (pH 8.5); 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1M KCl, 1mg/ml BSA
Y <sup>+</sup> /Tango (2x) :	66mM Tris-Azetat (ph 7,9); 20mM Mg-Azetat; 132 mM KaAzetat; 0,2mg/ml BSA
Quiagen-Puffer für die DNA-Maxipräparation:	
P1	50 mM Tris/HCL, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 µg/ml RNase A (frisch zugeben)
P2	200 mM NaOH; 1% SDS
P3	2,55 M KAc, pH 4,8
QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS ; 15% Ethanol; 0,15% Triton X100; pH 7,0
QC	1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Ethanol; pH 7,0
QF	1,25 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Ethanol; pH 8,2

### 3.5 Medien

Die für die Zell- und Bakterienkultur verwendeten Medien und Medienzusätze wurden von den Firmen Gibco BRL (Eggenstein), Difco (Detroit/USA), Sigma (München) und Boehringer (Mannheim) bezogen.

**Bakterien:** LB-Medium: Trypton:10 g/l; Hefeextrakt: 5 g/l; NaCl:10 g/l

Antibiotika Stammlösung: Amp<sup>50</sup> (50 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in H<sub>2</sub>O) Das LB-Medium für die Bakterienkultur wird mit deionisiertem H<sub>2</sub>O angesetzt, der pH auf 7.5 eingestellt und anschließend autoklaviert (25 min, 121°C). Zum Gießen von Agarplatten wird dem Medium vor dem Autoklavieren 1.5% Agar zugesetzt, und der Bakterien-Agar nach dem Abkühlen auf Handwärme in 10cm Petrischalen gefüllt (ca. 20 ml/Schale). Die Platten werden mit leicht geöffnetem Deckel unter der Sterilbank stehen gelassen, bis der Agar erstarrt und ausreichend getrocknet ist. Für Selektiv-Medium bzw. -Agar wird nach dem Abkühlen auf ca. 60°C

das entsprechende Antibiotikum aus der 1000x Stammlösung zugesetzt. Nicht sofort verwendete Platten können bei 4°C maximal 3 Monate gelagert werden.

**Zellkultur:** Die Grundmedien werden durch Zugabe von Medienzusätzen aus in der Regel 100x Stammlösungen komplettiert. Das FCS wird vor Gebrauch aufgetaut und 30 min bei 56°C erhitzt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. L-Glutamin ist instabil, und wird angesetztem Medium nach 2 Wochen erneut zugesetzt.

Standard-Medium:

RPMI 1640 oder DMEM (1000mg/l Glucose) (beides Gibco, Eggenstein)

Zusatz	Endkonzentration (Hersteller)	
FCS	10 %	(Seromed)
L-Glutamin (200mM)	2 mM	(Gibco, Eggenstein)
Na-Pyruvat (100mM)	1 mM	(Gibco, Eggenstein)
Pen/Strep (10000E/10mg/ml)	100 U/ml	(Gibco, Eggenstein)
2-Mercaptoethanol (20µM)	0.1 mM	(Merck, Darmstadt)

Zellen in Kultur sowie Antikörperhybridome wurden alle in DMEM-Standardmedium mit 10% FCS gehalten. Den Antikörperhybridomen wurde gegen Pilzbefall zu 500ml Medium 2ml Amphotericin B (250µg/ml Fungizone von Gibco) zugegeben. Die Proliferationsexperimente mit primären T-Zellen (TCR.Tg4) wurden in DMEM-Standardmedium mit 2% FCS durchgeführt. Das Proliferationsexperiment TCR.Tg4 auf Dendritischen Zellen wurde in RPMI-Standardmedium mit 10% FCS durchgeführt. Die IL-2 abhängige Zelllinie CTLL-2 wurde in DMEM-Standardmedium mit 10% FCS und 20% C63-Überstand (IL-2 produzierende Zelllinie) gehalten. Zur Gewinnung von Dendritischen Zellen aus Knochenmark wurde RPMI-Standardmedium ohne Pyruvatzugabe mit 10% FCS und 10% GM-CSF-haltigen Überstand der Zelllinie F1/16 benutzt. Den mit CIITA transfizierten L-Zelllinien wurde 200µg/ml Hygromycin zugegeben.

### 3.6 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pBLCAT6	CAT-Reporter-Plasmid, benutzt um SV-40 Intron und Poly A zu gewinnen (ATCC77413; (Boshart et al., 1992))
pHβApr-2-gpt (I-A <sup>u</sup> β)	Expressionsplasmid mit I-A <sup>u</sup> -β cDNA unter Kontrolle des humanen β-Aktinpromoters (Gunning et al., 1987)
pHβApr-2-neo (I-A <sup>u</sup> α)	Expressionsplasmid mit I-A <sup>u</sup> -α cDNA unter Kontrolle des humanen β-Aktinpromoters (Gunning et al., 1987)
pDR51	Plasmid mit genomischer pDRβ-Promotersequenz und cDNA von DRβ51 (Fukui et al., 1997; Yamamoto et al., 1994)

### 3.7 Bakterienstämme

DH1: rekombinationsdefizienter E.coli-Stamm (Hanahan, 1983; Meselson und Yuan, 1968)

JM110: methylierungsdefizienter E.coli-Stamm (Yanisch-Perron et al., 1985)

### 3.8 Zell-Linien

Bezeichnung	Beschreibung
1934.4	T-Zell Hybridom spezifisch für I-A <sup>u</sup> + MBP <sub>1-10</sub> (Wraith et al., 1989)
L-Zellen (I-A <sup>u</sup> )	L-Zellen (Itk <sup>+</sup> Maus-Fibroblastenzelllinie) transfiziert mit I-A <sup>u</sup> -cDNA (von C.A.Janeway jr. et al.)
L-Zellen (CIITA)	L-Zellen transfiziert mit CIITA-cDNA in pCDNA I-Vektor (Invitrogen) unter Kontrolle des CMV-Promoters (von Stacey Hill)
C63	L-Zellen (L929) transfiziert mit humaner IL-2 cDNA unter CMV-Promoter
CTLL-2	Murine zytotoxische T-Zell Linie, proliferiert in Abhängigkeit von IL-2 und wird daher als IL-2 Indikator Zelllinie eingesetzt.

### 3.9 Mauslinien

	Name (MHC-Haplotyp)
Inzuchtstämme	C57BL/6 (H-2 <sup>b</sup> ) DBA/2 (H-2 <sup>d</sup> ) B10.PL (H-2 <sup>u</sup> )
Transgene Mauslinien	TCR.Tg4 (H-2 <sup>u</sup> ) (Liu et al., 1995) zurückgekreuzt auf B10.PL Invariante Kette Knockout (Ii-ko) (auf C57BL/6-Hintergrund) (Viville et al., 1993)

Homozygote TCR.Tg4, einzeltransgene Mäuse wurden mit B10.PL gekreuzt und heterozygot in den Experimenten eingesetzt (MHC-Haplotyp : H-2<sup>u</sup>). Die Inzuchtlinien DBA/2 und C57BL/6 entstammen eigener Züchtung oder wurden von WIGA (Hannover) bezogen. B10.PL wurden von Jackson Laboratories bezogen. Die transgene Linie TCR.Tg4 exprimiert den transgenen TCR, der von dem für I-A<sup>u</sup>+MBP<sub>1-11</sub> spezifischen T-Zell-Hybridom 1934.4 stammt. Diese Linie wurde von David Wraith zur Verfügung gestellt. Wenn Kreuzungen mit heterozygoten Tieren durchgeführt wurden, wurden die Nachkommen entweder über Blut (FACS-Analyse mit PBL's) oder mittels PCR der Schwanz-DNA getestet.

### 3.10 Antikörper

Spezifität	Klon	Gekoppelt (Verd.)	Spezies	Isotyp	Referenz
CD8 $\alpha$	53-6.7	-Biotin (1:100) -PE (1:100) -FITC (1:100) -Red613* (1:50)	Ratte	IgG2a	(Ledbetter und Herzenberg, 1979)
CD4	H129.19	-Red613* (1:50) -Biotin (1:100)	Ratte	IgG2a	(Cobbald et al., 1984)
CD4	GK1.5	-PE (1:100) -FITC (1:100)	Ratte	IgG2b	(Dialynas et al., 1983)
CD45R/B220	RA3-6B2	-Biotin (1:100) -PE (1:100) -FITC (1:100)	Ratte	IgG2a	(Coffman, 1982)
V $\beta$ 8.1/8.2-TCR	F23.1**	-bio (1:100) -FITC (1:50)	Maus	IgG2a	(Staerz et al., 1985)
V $\alpha$ 2-TCR	B20.1	-Biotin (1:100)	Ratte	IgG2a	(Gregoire et al., 1991)
V $\alpha$ 3.2-TCR	RR3-16	-Biotin (1:100)	Ratte	IgG2b	(Utsunomiya et al., 1989)
V $\alpha$ 11.1/2-TCR	RR8-1	-PE (1:50)	Ratte	IgG2b	(Jameson et al., 1991)
I-A $\beta^{k,f,r,s,u}$	10-2-16**	-Biotin (1:100) -FITC (1:100)	Maus	IgG2b	(Oi et al., 1978)
I-A $^{b,f,r,s,v}$	KH74**	-Biotin (1:100)	Maus	IgG2a	(Hasenkrug et al., 1987)
I-A $^{b,d,u}$	Y3P**	-Biotin (1:100) -FITC (1:100)	Maus	IgG2a	(Janeway et al., 1984)
I-A $\beta^{u,s,f}$	MKS4**	-Biotin (1:50) -FITC (1:50)	Maus	IgG2b	(Kappler et al., 1981)
H-2K $^k$	H100.27.55**	-FITC (1:100)	Maus	IgG2a	(Lemke et al., 1979)
H-2K $^{b,u}$	K10.56-1**	-Biotin (1:50)	Maus	IgG2b	(Hammerling et al., 1982)
H-2K $^d$	K9-18**	-Biotin (1:200) -FITC (1:200)	Maus	IgG2a	(Arnold et al., 1985)
H-2D $^d$	34-2-12	-Biotin (1:50) -PE (1:50)	Maus	IgG2a	(Ozato et al., 1982)
H-2D $^b$	KH-95	-Biotin (1:100) -FITC (1:100)	Maus	IgG2b	(Hasenkrug et al., 1987)
CD11c	HL3	-Biotin (1:50) -FITC (1:50)	Hamster	IgG,1	(Metlay et al., 1990)
CD80	16-10-A1	-Biotin (1:50)	Hamster	IgG,2	(Razi-Wolf et al., 1992)
CD86	GL1	-Biotin (1:50)	Ratte	IgG2a	(Hathcock et al., 1993)
CD69	H1.2F3	-Biotin (1:50)	Hamster	IgG,1	(Yokoyama et al., 1988)
CD44	IM7	-Biotin (1:100) -FITC (1:100)	Ratte	IgG2b	(Trowbridge et al., 1982)
CD62L	MEL-14	-Biotin (1:50)	Ratte	IgG2a	(Gallatin et al., 1983)
CD25	7D4	-Biotin (1:50)	Ratte	IgM	(Malek et al., 1983)
CD29	HM $\beta$ 1-1	-Biotin*** (1:50)	Hamster	IgG,2	(Noto et al., 1995)
CD16/CD32	2.4G2	(1:100)	Ratte	IgG2b	(Unkeless, 1979)

\* von GIBCO; \*\* Im Labor hergestellt; \*\*\*Im Labor biotinyliert

Alle obigen Antikörper, außer die besonders gekennzeichneten, wurden von BD-Pharmingen bezogen und in der angegebenen Verdünnung eingesetzt. Die Spezifität bezieht sich immer auf Maus.

### 3.11 PCR-Primer

Die folgenden PCR-Primer wurden entweder frei ausgewählt oder sie wurden mit Hilfe des Computerprogramm Primer-Select aus dem Lasergene Software-Paket gewählt. Die Primer wurden von Dr. Weinig (DKFZ, Heidelberg) synthetisiert. Es sind nur die Primer zum Testen

von Schwanz-DNA und für die RT-PCR gezeigt. Die Primer zum Erstellen der DNA-Konstrukte sind gesondert im Ergebnisteil aufgeführt.

Tail-PCR:

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
β <sub>2</sub> m-1	CACCGGAGAATGGGAAGCCGAA
β <sub>2</sub> m-2	TCCACACAGATGGAGCGTCCAG
5'-TCR.Tg4-β	ATGTCTAACACTGCCTTC
3'-TCR.Tg4-β	TCAGGAATTTTTTTTCTTGAC
5'-TCR.Tg4-α	ATGATTGTGATGCTCCTCA
3'-TCR.Tg4-α	TCAACTGGACCACAGCCT
5'-β-genomic	CTCAGTGACAGATTTCTACC
3'-α/β splice	CTGCTCCCATTTCATCAGTTC
5'-α-genomic	TGTCCCTCTTCATGGAAGAA
3'all	CTCTACAAATGTGGTATGGC

Folgende Primer wurden für die RT-PCR benutzt :

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
HGPRT1	GTTGGATCAAGGCCAGACTTTGTTG
HGPRT2	GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT
Actin 5'	GGCATCGTCACCAACTGGGACGAC
Actin 3'	ATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGC
5'-β-genomic	CTCAGTGACAGATTTCTACC
3'-α/β splice	CTGCTCCCATTTCATCAGTTC
5'-α-genomic	TGTCCCTCTTCATGGAAGAA
3'α/β-genomic	CACAGAAGTAAGGTTCTTC
3'βu-genomic	CTTACAGTCTGAGACAGTCA

### 3.12 Peptide

Die Peptide wurden mittels Festphasensynthese nach der Fmoc/tBU-Strategie von Dr. R. Pipkorn (DKFZ, Heidelberg) synthetisiert. Die Peptide wurden über HPLC aufgereinigt und das Produkt massenspektrometrisch überprüft. Zwei Peptide wurden am N-Terminus acetyliert.

Bezeichnung	Sequenz N→C
Ac1-10 (4K)	Ac-NH-A S Q K R P S Q R S-COOH
Ac1-10 (4Y)	Ac-NH-A S Q Y R P S Q R S-COOH
GD SG 1-10 (4K)	NH <sub>2</sub> -G D S G A S Q K R P S Q R S-COOH
GD SG 1-10 (4Y)	NH <sub>2</sub> -G D S G A S Q Y R P S Q R S-COOH

Ac-: Acetylgruppe; NH<sub>2</sub>-: Aminogruppe; -COOH: Carboxylgruppe

## **4. Methoden**

### **4.1 Molekularbiologie**

#### **4.1.1 Lagerung von Bakterien**

Bakterienstämme werden auf (Selektiv-) Agarplatten ausgestrichen, 24 h bei 37°C bebrütet und bei 4°C aufbewahrt. Sie sind so einige Wochen haltbar. Zur langfristigen Lagerung werden 0.5 ml einer üN-Kultur mit 0.5 ml Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Entnahme wird mit einem sterilen Skalpell ein kleines Stückchen von den gefrorenen Bakterien geschabt und auf eine (Selektiv) Agarplatte ausgestrichen.

#### **4.1.2 Präparation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter E. coli Zellen**

Mit einer Einzelkolonie DH1 Zellen wird eine ÜN-Kultur in 50 ml LB Medium herangezogen. 400ml frisches LB Medium werden mit 10 ml der DH1 üN-Kultur angeimpft. Die Bakterien werden im Schüttelinkubator ca. 3 h bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0.3-0.5 wachsen gelassen, in 50 ml Falcon-Röhrchen alliquotiert und abzentrifugiert (2500 Upm, 10 min, 4°C). Alle folgenden Arbeiten werden steril und bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die Pellets werden in je 16.5 ml eiskaltem, frisch hergestelltem Rf 1 resuspendiert. Die Suspension wird 20 min auf Eis inkubiert, und die Zellen erneut abzentrifugiert (2500 Upm, 10 min, 4°C), in je 4 ml Rf 2 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Fraktionen werden gepoolt (gesamt 32 ml) und mit gekühlten Pipettenspitzen nach Wunsch in 1.5 ml Reaktionsgefäße alliquotiert. Die kompetenten Zellen werden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Eine Testtransformation mit 1 ng doppelsträngiger, zirkulärer Plasmid-DNA auf 100 µl kompetente Zellen sollte mehr als  $3 \times 10^3$  Kolonien ergeben.

#### **4.1.3 Transformation von kompetenten E. coli Zellen mit Plasmid DNA**

Die Transformation erfolgte nach einer modifizierten Hitzeschockmethode. Es wurde je ein Alliquot kompetenter Bakterien (50µl) bei RT aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Zu den aufgetauten Zellen gab ich 0,5-1µl meiner Plasmid-DNA. Es wurde immer auch eine Kontrolle ohne DNA mitgeführt. Die Bakterien-Plasmid Mischung wurde 30 min auf Eis inkubiert und darauf für 40 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach nochmaliger Inkubation für 2 min auf Eis wurde 800 µl auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und alles auf dem Schüttler für 30 - 60 min bei 37°C inkubiert (Expression des β-Lactamasegens). Daraufhin wurden die Bakterien abzentrifugiert, das Pellet in den restlichen 100µl Medium resuspendiert und 1/10 und 9/10 auf ampicillinhaltigen (100µg/ml) LB-Platten ausgestrichen. Da nur die Zellen auf Ampicillin wachsen können, welche β-Lactamase exprimieren, können nur solche Zellen wachsen, die erfolgreich mit einem Plasmid transformiert wurden, das die Ampicillin-Resistenz trägt.

#### 4.1.4 DNA-Minipräparation (alkalische Lyse)

Der Deckel eines 1.5 ml Reaktionsgefäßes wird mit einer Kanüle durchstoßen und mit 1 ml Selektivmedium gefüllt. Das Medium wird mit einer Bakterienkolonie angeimpft und im Schüttelinkubator üN bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und in 150 µl Prälyse-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 300µl Lyse-Puffer und 5 min Inkubation auf Eis werden die Zellen lysiert und bilden einen klaren Schleim. Die Zugabe von 250 µl KAc/HCOOH-Puffer führt zur sofortigen Neutralisierung der Lösung, wodurch Proteine und genomische DNA vernetzt ausfallen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wird die Probe abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und aus dem in ein neues Reaktionsgefäß überführten Überstand die Plasmid-DNA mit 400µl Isopropanol gefällt (5 min, RT). Die Plasmid-DNA wird abzentrifugiert, (5 min, 13000 Upm), das Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl TE gelöst. Zur Degradierung von verunreinigender RNA wird 0.5 µl RNase (10mg/ml) zur Plasmid-DNA pipettiert. Für einen analytischen Verdau wird 1 µl der Plasmid-DNA verwendet.

#### 4.1.5 DNA-Maxipräparation (alkalische Lyse)

Benötigt man eine größere Menge von sauberer und oft verwendeter Plasmid-DNA so wird eine Maxipräparation aus Bakterien gemacht. Dazu werden 100-200 ml Selektivmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und üN im Schüttelinkubator bei 37°C in einem 1000ml Kolben inkubiert. Die Bakterienkultur wird geerntet (5 min, 6000 Upm, 4°C), und das Bakterienpellet in 6 ml Prälyse-Puffer in 50 ml Falconröhrchen resuspendiert. Die Bakterien werden durch Zugabe von 14 ml Lyse-Puffer lysiert (5 min, 4°C). Die Zugabe von 10,5 ml KAc/HCOOH-Puffer unter mehrmaligem Schwenken führt zur sofortigen Neutralisation der Lösung, wodurch Proteine und genomische DNA vernetzt ausfallen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wird die Probe abzentrifugiert (5 min, 6000 Upm) und der Überstand durch einen locker mit Glaswolle gestopften Trichter filtriert. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA mit 0.6 Volumen Isopropanol gefällt (5 min, RT) und abzentrifugiert (5 min, 6000 Upm). Das Pellet wird in 4 ml TE resuspendiert und weiter aufgereinigt indem 4 ml 4M LiCl zupipettiert und nach der Fällung von Verunreinigungen (5 min, 4°C) erneut abzentrifugiert wird (5 min, 6000 Upm). Die Plasmid-DNA im Überstand wird anschließend mit 20 ml eiskaltem 100% Ethanol gefällt (15 min, -20°C), abzentrifugiert (5min, 6000 Upm), mit 70 % Ethanol gewaschen und in 1 ml TE aufgenommen. In einem 1.5 ml Reaktionsgefäß werden 5 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und die RNA verdaut (30 min, 37°C). Nach Salzzugabe (8µl 4M NaAc pH5.6 pro 100 µl DNA-Lsg.) wird die Plasmid-DNA 3x mit Phenol/Chloroform und 2x mit Chloroform extrahiert, mit Isopropanol gefällt und mit 70 % 2-Propanol gewaschen. Das getrocknete (15min, 37°C) Pellet wird in 0.1-1 ml TE aufgenommen. Die Präparation liefert ca. 0.5-2 mg Plasmid-DNA.

Alternativ zur obigen Methode wurde die Plasmid-DNA über eine Ionenaustauscher-Säule (Quiagen-tip 500) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt: Die DNA Präparation erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen SDS-Lyse und anschließender Reinigung über Anionenaustauschchromatographie. Die mit dem entsprechenden Plasmid transformierten Bakterien werden üN bei 37°C in 250 ml Selektivmedium angezogen und geerntet (4000 Upm, 10 min, 4°C). Der Zellaufschluß erfolgt analog zur Minipräparation (alkalische Lyse), durch



Resuspendieren des Pellets in 10 ml P1, Lasieren der Zellen durch Zugabe von 10 ml P2 (5 min, RT) und schlagartiger Neutralisation durch 10 ml P3 mit anschließender 20 min Inkubation auf Eis. Zelltrümmer und vernetzt ausgefallene Chromosomale DNA werden abzentrifugiert (30 min, 15000 Upm), und der klare Überstand auf eine zuvor mit 10 ml equilibrierte Anionenaustauschersäule (Qiagen-tip 500) geladen. Nach 2x Waschen der Säule mit 30 ml QC wird die DNA mit 15 ml QF von der Säule eluiert, mit 12 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (15000 Upm, 30 min, 4°C). Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen und in 0.1-0.5 µl TE aufgenommen. Die Ausbeute an Plasmid-DNA wird durch Absorptionsspektroskopie bestimmt.

#### 4.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

**Spektroskopische Konzentrationsbestimmung:** Die Basen der DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, das zu Konzentrationsbestimmung von nukleinsäurehaltigen Lösungen benutzt werden kann. Das Spektrum einer 1:200 Verdünnung wird im Bereich 300-220 nm gegen H<sub>2</sub>O gemessen. Die Extinktion sollte zwischen 0.1-1.5 liegen, da in diesem Bereich Extinktion und Nukleinsäurekonzentration proportional zueinander sind. Zur Umrechnung gilt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg dsDNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg ssDNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ µg ssOligonukleotide/ml}$$

Da die aromatischen Aminosäurereste in Proteinen bei 280 nm absorbieren, kann eine Verunreinigung der isolierten Nukleinsäuren nach der Warburgschen Formel  $((1.45 \times \text{OD}_{280}) - (0.74 \times \text{OD}_{260})) = \text{mg Protein/ml}$  berechnet werden. Der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  einer sauberen DNA-Präparation sollte bei 1.8 liegen.

**Konzentrationsbestimmung über Vergleich mit Markerbanden im Gel:** Die Methode liefert einen Schätzwert, gibt dafür aber Auskunft über die Plasmid- bzw. Fragmentgröße und Nukleinsäureverunreinigungen wie RNA und chromosomale DNA.

Eine definierte Markermenge 1 µg 1kb-Leiter (Gibco) und 1-5 µl Probe werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Intensitäten von Probe und Referenzbande unter UV-Licht verglichen. Die 1.6 kb-Bande dient als Anhaltspunkt, sie enthält 10 % der aufgetragenen Marker-DNA, d.h. 100 ng.

#### 4.1.7 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Methode dient der Abtrennung von verunreinigenden Proteinen aus einer nukleinsäurehaltigen Lösung. Zu der DNA-Lösung wird 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben, und kräftig gemischt, bis sich eine Emulsion bildet. Die Emulsion wird zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, RT) und die obere wässrige Phase ohne das weiße Proteinpräzipitat in der Interphase in ein neues Reaktionsröhrchen gegeben. Die Lösung wird nun wie oben beschrieben mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Um die von Protein gereinigte DNA zu isolieren, wird die DNA aus der wässrigen Phase über eine Ethanolfällung präzipitiert und in TE aufgenommen. Für die Extraktion von RNA-haltigen Lösungen wird ein spezielles Phenol mit anderem pH verwendet.

#### 4.1.8 DNA-Präzipitation

**Ethanol-fällung:** Zu nukleinsäurehaltigen Lösungen werden 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 6.0) und 2,5 Vol. Ethanol gegeben. Nach gründlichem Mischen wird für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min). Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen (2 min, RT), erneut abzentrifugiert (13000 Upm, 5 min), getrocknet (Heizblock 37°C, 5 min) und in TE aufgenommen.

**Isopropanol-fällung:** Die Fällung erfolgt im Prinzip wie oben beschrieben. Nach Zugabe von 3M NaAc (pH 6.0) wird jedoch das 0.7-fache Vol. Isopropanol zugegeben, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Sedimentation, Waschen und Trocknen, der DNA werden wie bei der Ethanol-fällung durchgeführt.

#### 4.1.9 Restriktionsverdau

Für analytische Zwecke werden 1 µg Plasmid-DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Präparation von Fragmenten wurden in einem Volumen von 50 µl 10 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym 3 h bis üN bei 37°C verdaut. Ansätze mit Enzymen, die bei abweichenden Temperaturen schneiden (z.B. SmaI bei 30°C) werden bei diesen Bedingungen inkubiert. Gemäß den Pufferansprüchen der Enzyme werden die Restriktionsverdau in verschiedenen Puffertypen (Blue, Red, Green, Yellow und spezielle Puffer für einzelne Restriktionsenzyme) durchgeführt. Genomische DNA wurde immer ÜN mit zusätzlich 5mM Spermidin verdaut.

#### 4.1.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

**Quiagen-Säulchen (Qiaquick spin columns):** Die DNA-Bande wird bei 366 nm unter dem UV-Transilluminator aus dem Gel geschnitten, gewogen und in 300 µl QG/100 µg Gel vollständig aufgelöst (50°C, 10 min Schütteln). Die Probe wird auf ein Schleudersäulchen in einem 2 ml Abfallröhrchen gegeben und zentrifugiert (13000 Upm, 1 min). Die Säule wird mit 750µl PE gewaschen (13000 Upm) und durch eine zweite Zentrifugation getrocknet (13000 Upm/1 min). Das Fragment wird mit 50 µl EB von der Säule gelöst (20 min RT), und das Fragment in eine 1.5 ml Reaktionsgefäß eluiert (13000 Upm, 1 min). Zur Kontrolle werden 5µl des Fragments auf einem Gel analysiert.

**Elektroelution:** DNA, die für eine Mikroinjektion in Zygoten zur Herstellung transgener Mäuse vorgesehen ist, wird mittels Elektroelution extrahiert, die eine höhere Reinheit aufweist. Das Gelstück mit der gewünschten DNA-Bande wird in ein TAE-gefülltes Glasröhrchen des Obergefäßes der Elektroelutionsapparatur blasenfrei transferiert, das am unteren Ende mit Hilfe eines Gummiringes durch ein DEAE-Papier verschlossen ist (geschützt durch einen Dialyseschlauch). Das Obergefäß (mit der Kathode) wird auf das Untergefäß (enthält Anode) gesetzt, beide Kammern mit TAE-Puffer gefüllt und die DNA aus dem Gel auf das DEAE-Papier transferiert (200V, 10-12 min., 10-12 mA pro Glasröhrchen). Das DEAE-Papier wurde entnommen, für 30 min bei RT getrocknet und für 20 Sek. in 100% Ethanol geschwenkt. Nach 10 min Trocknen wird das Papier für 20 Sek. in TE (pH 8,0) geschwenkt und erneut für mind. 30 Min. getrocknet. Nach einem zweiten Waschschrift in 100% Ethanol wird das trockenen DEAE-Papier auf den DNA-enthaltenden Teil zurechtgeschnitten und in ein 0,5 ml

Eppendorfreaktionsgefäß (mit einem Loch im Boden) gegeben, das auf ein deckellooses 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß gesetzt wird. Das Papier wird mit 30µl 1,5M NaCl in TE be-  
träufelt, beide Gefäße mit Parafilm abgedichtet und für 30 min in einem 65°C Wasserbad inkubiert. Nach einem schnellen Zentrifugieren wird dieser Elutionsschritt wiederholt und das Endvolumen von 50µl mit 70µl H<sub>2</sub>O verdünnt, um ein Ausfallen des Salzes bei der nachfolgenden Ethanolfällung zu verhindern, die mit 300µl eiskaltem 100% Ethanol für 15 min. bei -80°C erfolgt. Nach der Zentrifugation (13000rpm, 3 min, 4°C) wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet lässt man für 37°C bei RT trocknen und nimmt es dann in 50µl Mikroinjektionspuffer auf. 5µl werden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und daraufhin die DNA-Konzentration auf 2-6ng/µl eingestellt. Nach dem Sterilfiltrieren durch einen 0,22µm Porenfilter kann die DNA in befruchtete Eizellen injiziert werden.

#### **4.1.11 Ligation von DNA-Enden**

Bei der Ligation von zwei DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wird das Insertfragment in einem 3-fachen Überschuß zum dephosphorylierten Vektorfragment (50-100 ng) eingesetzt. Die Ligation erfolgt in Ligationspuffer mit 5 U T4-Ligase für 1-15 h bei RT in einem Volumen von 15 µl. Die Hälfte eines Ligationsansatzes wird zur Transformation verwendet.

#### **4.1.12 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Um eine Selbstligation von geöffneten Vektoren zu verhindern, wird die 5'-Phosphatgruppe an den DNA-Enden durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP; Calf Intestine Alkaline Phosphatase) entfernt. In der Regel wird nach Ende des präparativen Restriktionsverdau 1-10 U CIP pro µg DNA direkt in den Verdau pipettiert und für 30 min weiter bei 37°C inkubiert. Ein Entfernen der CIP ist nicht nötig, wenn der Verdau über ein Gel gereinigt wird. In Fällen, in denen dies nicht ausreichend ist, wird die DNA mit Ethanol gefällt, in 20 µl CIP-Puffer aufgenommen und mit 1-10 U CIP pro µg DNA für 1 h bei 37°C inkubiert. Die CIP kann alternativ zum Gel durch 20 min Erhitzen auf 70°C deaktiviert und anschließende Ethanolfällung entfernt werden. Die vollständige Dephosphorylierung wird über eine Kontrolligation des Vektorfragments getestet, es dürfen nur sehr wenige Bakterienkolonien wachsen.

#### **4.1.13 Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA**

DNA-Gelelektrophorese: DNA-Fragmente im Bereich von 12-0.1 kb werden in Abhängigkeit von ihrer Länge in verschiedenen konzentrierten Agarosegelen (0.6-2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose wird in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, mit und zum Erstarren in eine Gelwanne gegossen. In die Gelwanne wird ein Kamm zum Aussparen der Geltaschen eingehängt. Nach dem Erkalten des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Proben werden mit 1/6 Lade-  
puffer gemischt, der die Referenzfarbstoffe enthält und das Absacken der DNA in die Taschen gewährleistet, und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird im Spannungsbereich von 20-110 Volt durchgeführt. Für präparative Gele erfolgte die Elektrophorese mit max. 7 V/cm Gellänge. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wird ein Längenmarker

(1kb-Ladder-Mix; Fermentas) mit aufgetragen. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 15 min in eine Schale mit 500 ml Ethidiumbromid-Lösung (1x TAE, 0.5µg/ml ETBr) gelegt. Die DNA-Banden werden auf dem UV-Transilluminator für präparative Gele bei 366 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer Videokamera-Thermodrucker-Einrichtung fotografiert. Analytische Gele werden mit einem Lumi-Imager (Boehringer Mannheim) dokumentiert.

#### 4.1.14 Isolierung von Schwanz-DNA

Die zur Southern-Analyse benötigte genomische DNA wird aus einem 0,5-1 cm Stück Schwanzspitze von Mäusen gewonnen (Laird et al., 1991). Das Schwanzgewebe wird in 700 µl Tail-Puffer aufgenommen. Es werden 10 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) zupipettiert, und das Schwanzgewebe üN bei 56°C inkubiert. Am folgenden Tag wird die Probe abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 550 µl Isopropanol und mehrmaliges Schwenken wird die genomische DNA ausgefällt. Sie wird mit einer zugeschmolzenen Glaskapillare zur Schmelzpunktbestimmung aufgefischt und 10 Sek zuerst in 70 % Ethanol und dann in 100 % Ethanol gewaschen. Die an der Glaskapillare anhaftende DNA wird an der Luft 5 min getrocknet und das Kapillarende in ein Reaktionsgefäß mit je nach DNA-Menge 100-500 µl TE abgebrochen. Durch Schütteln bei 65°C auf einem Thermoschüttler löst sich die DNA. Für die Southern-Analyse werden 20 µl DNA verdaut.

Wird Schwanz-DNA zur Verwendung in einer PCR-Reaktion gewonnen wird vorgegangen wie eben beschrieben mit folgenden Änderungen, um die Kontaminationsgefahr zu reduzieren: 1. Reinigung der Schere nach jedem genommenen Schwanzende. 2. Die Waschschrte mit 70% und 100% Ethanol erfolgen für jede Probe in eigenen Eppendorfreaktionsgefäßen.

#### 4.1.15 Southern-Blot

**Herstellung Digoxigenin markierten DNA-Sonden:** Zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde für die Southern-Hybridisierung wurde der DIG-labeling Mix (Boehringer Mannheim) verwendet. Zwischen 50-500 ng aufgereinigtes Fragment in 14 µl TE werden 10 min bei 95°C denaturiert, schnell abzentrifugiert (13000 rpm, 10 sec) und auf Eis abgekühlt. Zu dem Fragment werden 2 µl DLB, 1 µl Zufalls-Hexamere und 2 µl dNTP-Markierungsgemisch pipettiert, gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (5 U) gestartet. Die Markierungsreaktion erfolgt für 3 h bis üN bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch eine anschließende Gelfiltration über eine P60 Sepharose-Säule entfernt und die DIG-markierte Sonde mit 400µl 50mM NaCl in TE eluiert.

Zur Detektion der β-Kette (pDR-K-splice oder pDR-Y-splice) in den Founder-Mäusen wurde als Sonde das 744 bp-Bgl II Fragment von pDR-K-splice verwendet. Die Schwanz-DNA wurde dazu mit Bgl II verdaut. Zur Unterscheidung von pDR-K-splice und pDR-Y-splice wurde ein Verdau mit Eam1104 L (entspricht Ear I) / Hind III durchgeführt. Das Signal für pDR-K-splice liegt bei 594 bp, das von pDR-Y-splice bei ca. 1000 bp. Zur Detektion der α-Kette (pDR-α-splice) in den Founder-Mäusen wurde als Sonde das 719bp-Hind III/Bgl II Fragment von pDR-α-splice verwendet. Die DNA wurde dazu mit Bpi-I (entspricht BBSI) verdaut. Dabei entsteht eine Bande von 719 bp.

**Blotten:** Nach dem Verdau der genomischen DNA, der gelelektrophoretischen Auftrennung und Dokumentation wurde das unter Schütteln zur Denaturierung der DNA für 30 min in Denaturierungslösung behandelt. Das Gel wird nachfolgend unter Schütteln 2 x 15 min in Neutralisierungslösung behandelt. In einem Kapillartransfer wird die DNA aus dem Gel auf Nitrozellulosefilter (spätere Entwicklung mit NBT/BCIP) übertragen. Dazu werden folgende Lagen unter Vermeidung von Luftblasen stapelförmig übereinander gelegt: zwei Bahnen Whatman-Papier, die mit den Enden in Reservoirs mit 20xSSC als Transferpuffer tauchen; das DNA-Gel; der (die) mit Wasser vorbenetzte Filter (Membran); 1-2 Lagen Whatman-Papier; 15 cm saugfähige Einmal-Papierhandtücher. Durch den Flüssigkeitssog aus dem Reservoir in den Papierhandtuch-Stapel wird die DNA zum Filter gezogen und haftet an ihm fest. Die DNA wird am folgenden Tag auf dem Trägermaterial fixiert. Dazu werden Nitrozellulosefilter 2 h im Vakuumofen bei 80°C gebacken.

**Hybridisierung:** Der Filter mit der DNA wird bei 65°C in einem Schüttelwasserbad mindestens 1 h in 100 ml Prähybridisierungslösung vorhybridisiert, um unspezifische Bindung der Sonde an den Filter zu minimieren. Die Prähybridisierungslösung wird 10-20 x wiederverwendet und bei 4°C gelagert. Der Filter wird anschließend in 65°C im Schüttelwasserbad in 100 ml Hybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierungslösung enthält die Hälfte einer Sonde aus einer DIG-Markierungsreaktion, und wird vor Zugabe des Filters 10 min im Wasserbad aufgeköcht, um die Sonde zu denaturieren, kurz auf Eis abgekühlt und im Schüttelwasserbad auf 65°C temperiert. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde wird ca. 10 x wiederverwendet und eingefroren bei -20°C gelagert. Am Morgen nach der Hybridisierung wird der Filter 2 x 15 min in je 100ml vorgewärmter 65°C Waschlösung stringent gewaschen, um ungebundene Sonde zu entfernen, und ist jetzt bereit für die Signaldetektion.

**Detektion mit NBT/BCIP:** Die Signale auf dem hybridisierten Nitrozellulosefilter werden bei RT detektiert, indem der Filter nach den stringenten Waschschritten zunächst 1 min in Puffer-1 äquilibriert wird. Anschließend wird der Filter durch Schwenken in 30 ml Puffer-2 (30 min, RT) geblockt, um später eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Puffer-2 wird 10-20x wiederverwendet und bei -20°C gelagert. Der Filter wird nach dem Blocken kurz in Puffer-1 gewaschen und für 30 min in 10 ml Puffer-1 mit 150 mU/ml Alkalische-Phosphatase gekoppeltem anti-DIG-Antikörper ( $\alpha$ DIG-AP, Boehringer) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wird durch 2 x 10 min Waschen mit Puffer-1 entfernt. Zur Farbentwicklung wird der Filter kurz in Puffer-3 umgepuffert und unter Lichtausschluß in die Färbelösung gelegt (20 ml filtrierter Puffer-3, mit 90  $\mu$ l NBT-Lsg. und 70  $\mu$ l BCIP-Lsg.). Die blau-violetten Signale entwickeln sich innerhalb von 1-15 Stunden. Als Referenz wird ein über Klenow-Fragment End-Markierung mit DIG-dUTP erhaltener DIG-markierter DNA-Marker mitentwickelt.

#### 4.1.16 PCR

Sowohl für das Klonieren von DNA-Konstrukten, als auch für Analyse genomischer DNA und cDNA von transgenen Tieren wurde die PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) eingesetzt. Diese Methode erlaubt die spezifische Amplifikation einer definierten Region eines DNA-Moleküle in vitro. Die PCR verläuft in 3 Schritten, die in 20-40 Zyklen wiederholt durchlaufen

werden. Im ersten Schritt wird ein nachzuweisendes Stück DNA (Template) durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Durch Abkühlung auf eine Temperatur zwischen 45°C und 70°C wird kurzen (17-80 Nukleotide langen) einzelsträngigen Oligonukleotiden (Primer) die sequenz-spezifische Hybridisierung an die Template-DNA ermöglicht (Annealing). Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung der 3'-Enden der angelagerten Primer entlang der Template-DNA mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase (Elongation). Da die Primer so gewählt werden, daß die neu entstandenen DNA-Stränge beider Template-Stränge zueinander teilweise komplementär sind, erhält man durch den zyklischen Ablauf der 3 Schritte eine Verdopplung der DNA-Moleküle pro Zyklus. Es wurden alle PCR's mit der Taq/Pwo-Mixtur durchgeführt. Die präparativen PCR's (Klonieren der DNA-Konstrukte) wurden in einem Volumen von 100µl und die analytischen PCR's (genomische und RT-PCR) in einem Volumen von 25µl durchgeführt.

Reaktionsbedingungen: 1x Proofspringer-Puffer (incomplete); MgCl<sub>2</sub> 2mM; dNTPs je 300µM; Primer je 300-400nM; Taq/Pwo 1U/50µl

Pipettieransatz (25µl): 15,55µl ddH<sub>2</sub>O; 0,75µl dNTP (10 mM); 2,5µl 10x Proofspringer-Puffer (incomplete); 2µl MgCl<sub>2</sub> (25mM); je 0,5µl 5' bzw. 3'-Primer (je 20µM); 0,2µl Taq/Pwo (2,5 u/µl); 3µl Proben DNA

Für PCR mit genomischer Schwanz-DNA wurde die DNA 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt, 10 min bei 68°C unter Schütteln gelöst, für 4 min bei 95°C denaturiert, dann sofort auf Eis gestellt, und auf Eis zum PCR-Mix zupipettiert. Der PCR-Mix wurde direkt in den auf 95°C vorgeizten PCR-Heizblock gegeben und nochmals vor dem PCR-Programm für 5 min auf 95°C denaturiert.

Für die RT-PCR wurden Mengen zwischen 1 und 10µl der cDNA eingesetzt. Die PCR wurde erst mit einem Standard (Aktin oder endogenes MHC-Klasse II) durchgeführt, die Banden mittels LUMI-Imager quantifiziert, und daraufhin die Menge der eingesetzten cDNA-Menge normiert.

Zum Klonieren der DNA-Konstrukte wurden 100ng Template Plasmid-DNA in 100µl PCR-Mix eingesetzt.

#### 4.1.17 RT-PCR

Zum Nachweis der Expression der Transgene auf mRNA Ebene wurde RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR) eingesetzt.

**RNA-Isolierung aus Geweben der Maus:** Die Organe werden unverzüglich nach dem Tod des Tieres in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur RNA-Isolierung werden ca. 30mg (3mm<sup>3</sup>) Organ in 600µl RLT/6µl Mercaptoethanol für ca. 20-30 Sekunden in einem 2ml Eppendorfgefäß homogenisiert und Gewebereste anschließend abzentrifugiert (13000rpm, 15min, 4°C). Der Gewebekomogenisator wird zwischen verschiedenen Proben mit 0,1M NaOH und ddH<sub>2</sub>O gewaschen. 600µl Überstand werden mit gleichem Volumen 70% Ethanol gemischt und auf ein RNA-Säulchen (RNAeasy, Quiagen) gegeben. Nach der Zentrifugation (13000rpm, 30Sek.) wird die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen und das Säulchen zuerst

mit 700µl RW1 Puffer (13000rpm, 30 Sek.), dann zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen (13000rpm, 1. 30 Sek., 2. 2 min). Das Säulchen wird für 10 Minuten bei RT getrocknet und die RNA nach 2 Minuten Inkubation mit DEPC-H<sub>2</sub>O in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß zentrifugiert (13000rpm, 1 min). Die RNA-Menge wird photometrisch bestimmt und die Qualität Gelelektrophorese von 1µg RNA auf einem 1% Agarosegel kontrolliert. Unversehrte RNA zeigt sich in 3 Banden (18S-rRNA der kleinen 40S und 28S- sowie 5/5,8S-rRNA der großen 60S ribosomalen Untereinheit).

**Umschreiben von RNA in cDNA (reverse Transkription):** Um restliche genomische DNA zu verdauen, werden 3µg RNA in 10µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 40µl DNase-Mix (10µl 10x DNasepuffer, 5µl 10mM DTT, 21µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 2µl RNasin (rekombinanter RNase-Inhibitor von Promega), 2µl RQ1 DNase) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. DNase und andere Proteine werden durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt (Zugabe von 50µl Phenol/Chloroform, vortexen, 5 min bei 13000rpm abzentrifugieren). Nach dem Überführen des Überstands in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß wird 50µl Chloroform zugegeben, gevortext und erneut abzentrifugiert (13000rpm, 3 min). Der Überstand wird mit 1µg Glykogen versetzt und die RNA mit 125µl 100% eiskaltem Ethanol für 10 min bei -80°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (13000 rpm, 15 min, 4°C) wird das Pellet mit 125µl eiskaltem 75% Ethanol gewaschen, für 2 Minuten bei RT getrocknet, mit 10µl Primer-Mix aufgenommen (9µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 1µl 100µM dT<sub>15</sub>) gevortext, kurz abzentrifugiert und nach einer 10-minütigen Inkubation bei 68°C (schmilzt RNA-RNA-Hybride auf) schnell auf Eis gebracht, um eine Rehybridisierung der RNA zu vermeiden. Nach kurzem Zentrifugieren (13000rpm, 20 Sek.) wird 30µl RT-Mix (8µl 5xRT-Puffer, 4µl 100mM DTT, 2µl 10mM dNTPs, 13µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 1µl RNasin, 2µl M-MLV Reverse Transkriptase) zugegeben und die mRNA für 2 Std. bei 37°C in DNA revers transkribiert. Umspannen die Primer der nachfolgenden PCR-Reaktion kein Intron, so wird der Primer-Mix in zwei 5µl Fraktionen geteilt und nur eine Fraktion mit RT versetzt. Dies erlaubt die Identifikation einer DNA-Kontamination der Probe. Nach der reversen Transkription wird der Ansatz mit 60µl MQ-H<sub>2</sub>O verdünnt und 5µl in einer RT-PCR eingesetzt. Das erfolgreiche Umschreiben zu cDNA wird durch den Nachweis der cDNA für das Haushalts-Gen HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) oder β-Aktin kontrolliert. Alternativ zu den hier eingesetzten dT15-Primern, welche nur polyadenylierten RNA's umschreiben, wurden auch random Hexamere eingesetzt. Diese binden innerhalb der RNA's und können alle RNA's umschreiben.

#### 4.1.18 Programme und Produktgrößen für PCR und RT-PCR

Grund-Programm für die PCR:

Schritt Nr.:	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 sek
3. Annealing	variiert	variiert
4. Elongation	68°C	variiert (ca. 1kb/min)
5. zurück zu Schritt 2	Anzahl der Zyklen variiert	
6. Auffüllen	68°C	10-20 min
7. Kühlen	4°C	unbegrenzt

Verwendete Reaktions-Bedingungen der einzelnen Primer-Paare :

Primerpaar (5'/3'Primer)	Annealing	Elongation	Zyklen	Produktgröße(bp)
<b>Präparative PCR</b>				
SV40-Up/ SV40-down-new	60°C/30Sek	1 min	22	ca. 850
Up Primer B (K)/Primer Down	60°C/30Sek	1 min	30	799
Up Primer B (Y)/Primer Down	60°C/30Sek	1 min	30	799
UpPrimerCnew/PrimerDownNew	60°C/60Sek	1 min	25	783
I-A <sup>U</sup> -alpha-Up/I-A <sup>U</sup> -alpha-down	60°C/30Sek	1 min	25	ca. 900
<b>Analytische PCR</b>				
a. $\beta_2m$ -1 / $\beta_2m$ -2	58°C/30Sek	1 min.	32	ca. 300
b. 5'-TCR.Tg4- $\beta$ /3'-TCR.Tg4- $\beta$	*60→50°C 30 Sek	2 min	35	ca. 950
c. 5'-TCR.Tg4- $\alpha$ /3'-TCR.Tg4- $\alpha$	*60→50°C 30 Sek	2 min	35	ca. 700
d. 5'- $\beta$ -genomic/3'- $\alpha/\beta$ splice	58°C/30Sek	1 min.	32	530
e. 5'- $\alpha$ -genomic/3'-all	58°C/30 Sek	1 min	35	ca. 800
<b>RT-PCR</b>				
f. HGPRT1/HGPRT2	60°C/20Sek	40 Sek.	38	ca. 350
g. Actin 5' / Actin 3'	58°C/30Sek	1 min.	32	ca. 900
h. 5'- $\beta$ -genomic / 3'- $\alpha/\beta$ splice	*60→50°C 30 Sek	2 min	35	530 + 465
i. 5'- $\beta$ -genomic / 3'- $\alpha/\beta$ -genomic	*60→50°C 30 Sek	2 min	35	400
j. 5'- $\alpha$ -genomic / 3'- $\alpha/\beta$ -genomic	*60→50°C 30 Sek	2 min	35	200
k. 5'- $\beta$ -genomic / 3'- $\beta$ -genomic	*60→50°C 30 Sek	2 min	35	400

\*Für einige PCR's wurde ein sogenanntes Touch-Down-Programm verwendet, in welchen in den ersten 15 Zyklen die Annealing Temperatur von 60°C pro Zyklus um 1°C verringert wurde. Dann wurden weitere 25 Zyklen mit einer konstanten Annealing Temperatur von 50°C durchgeführt.

- Primer für endogene Kontrolle  $\beta_2m$ -genomisch
- Nachweis von TCR.Tg4- $\beta$ -Kette Transgen
- Nachweis von TCR.Tg4- $\alpha$ -Kette Transgen
- Nachweis von AMK oder AMY  $\beta$ -Ketten Transgen
- Nachweis von AMK oder AMY  $\alpha$ -Ketten Transgen
- Kontrolle für cDNA mit HGPRT
- Kontrolle für cDNA mit  $\beta$ -Aktin gespliced
- Primer für differentiellen Nachweis von gesplicter und ungesplicter cDNA von AMK oder AMY- $\beta$ -Ketten Transgen
- Nachweis von cDNA von AMK oder AMY- $\beta$ -Ketten Transgen (gesplict und ungesplict in einer Bande)
- Nachweis von cDNA von AMK oder AMY- $\alpha$ -Ketten Transgen (gesplict und ungesplict in einer Bande)
- Nachweis von endogener MHC Klasse II I-A-cDNA (nicht AMK oder AMY) unabhängig vom Haplotyp nur gespliced



## 4.2 Herstellung transgener Mäuse

### 4.2.1 Aufbau einer Mikroinjektionsanlage

Ein inverses Stereomikroskop mit einer Vergrößerung von 5x-200x ist mit zwei Mikromanipulatoren bestückt. Mit ihnen werden Injektions- und Haltenadels bewegt. Die Nadeln sind über mit Paraffinöl gefüllte Schläuche mit einem Paraffinöl-Reservoir verbunden. Über eine Rändelschraube und Kolben an den Enden der Schläuche kann Sog und Druck auf die Nadeln ausgeübt werden. Der Objekttisch ist mit einem Einsatz für eine 6 cm Petrischale ausgestattet.

### 4.2.2 Herstellung von Injektions- und Haltenadeln

**Injektionsnadeln:** Die Glaskapillaren werden in einen Mikropipetten-Puller eingespannt und nach Erhitzen ausgezogen. Die Rohlinge werden in der Mikroschmiede an der Spitze gebrochen. Ihr Innendurchmesser beträgt 15 µm. Anschließend werden sie in einem Winkel von 50° geschliffen. Die Spitze der Nadel wird zusätzlich um 30° abgebogen.

**Haltenadeln:** Die Haltenadeln werden ebenfalls mit einem Mikropipetten-Puller gezogen. Die Nadeln werden bei einem Innendurchmesser von 90-100 µm gebrochen und die Spitze in der Schmiede auf einen Innendurchmesser von 15-20 µm eingeschmolzen.

### 4.2.3 Präparation von Zygoten aus trächtigen Mäusen

Damit eine genügend große Anzahl von befruchteten Eizellen zur Verfügung steht, werden die Weibchen aus denen die Zygoten präpariert werden superovuliert. Als Zygotenspender werden 10 (C57BL/6 x DBA/2) F1 Weibchen verwendet. Ihnen wird 3 Tage vor der Präparation morgens 5-10 U Gonadotropin in 0,5 ml PBS i.p. zur Eireifung, und 1 Tag vor der Präparation morgens 5-10 U Chorionic-Gonadotropin in 0.5 ml PBS i.p. zum Eisprung gespritzt und die Weibchen anschließend mit (C57BL/6 x DBA/2) F1 Männchen verpaart. Am darauf folgenden Tag werden die Weibchen auf einen Vaginalpfropf getestet und positive Weibchen mit CO<sub>2</sub> getötet. Die Mäuse werden geöffnet, und die Eileiter mit einem Stück Uterus entnommen. Dazu wird der Uterus 1 cm vor dem Eileiter mit einer Pinzette gefaßt, Fettgewebe und Mesometrium abgestreift, und dann der Uterus hinter der Pinzette und der Eileiter direkt am Ovar durchtrennt. Die Eileiter werden in ein Glasblockschälchen mit M2-Medium, dem im ersten Schritt der Präparation Hyaluronidase zugesetzt wird (300 µg/ml), transferiert. Mit zwei spitzen Pinzetten werden die unter der Stereolupe in der Ampulle des Eileiters sichtbaren Zygoten freipräpariert, indem eine Pinzette die Ampulle abklemmt und mit der anderen die Ampulle aufgerissen und ausgestreift wird. Die Eizellen werden mit einer Kapillare, an die ein Schlauch und Mundstück angeschlossen sind, aufgelesen, und 2x in M2-Medium gewaschen. Bis zur Injektion der DNA in den männlichen Vorkern werden sie in eine Tropfenkultur M16-Medium transferiert und bei 37°C inkubiert.

### 4.2.4 Mikroinjektion der DNA-Konstrukte

Die linearisierten DNA-Konstrukte werden in einer Konzentration von 2-6 ng/µl in den männlichen Vorkern der Zygote injiziert, wobei dieser sichtbar an Volumen zunimmt.

#### **4.2.5 Zygotentransfer in scheinschwangere Ammenmäuse**

Drei Tage vor der Präparation der Zygoten aus den C57Bl/6 Mäusen werden 20 NMRI Weibchen im Alter von 10-20 Wochen zum Austragen der injizierten Zygoten mit vasktomierten Männchen verpaart. Am folgenden Morgen werden die Weibchen auf einen vorhandenen Vaginalpfropf getestet und positive Weibchen bis zum Transfer der Zygoten gesondert gehalten.

Zum Transfer der Zygoten werden die Ammenmäuse durch i.p.-Injektion von Ketanest/Rompun narkotisiert. Der Rücken wird zwischen Rippenbogen und Beckenkamm beidseitig mit einer Schermaschine rasiert und die Maus auf den Bauch gelegt. Die Haut wird mit einem sagitalen 1 cm Schnitt neben der Wirbelsäule unmittelbar hinter dem Rippenbogen eröffnet. Der Hautschnitt wird über den Fettkörper oberhalb des Uterus geschoben, die Bauchdecke mit einer spitzen Uhrmacher-Pinzette gefaßt und mit einem Schnitt geöffnet. Der am Ovar anliegende Fettkörper wird gesucht, mit einer stumpfen Pinzette gefaßt und zusammen mit Ovar, Ovidukt und Uterushorn aus der Bauchhöhle disloziert. Der Fettkörper wird mit einer Arterienklemme fixiert. Der Uterus wird mit einer feinen Pinzette nahe dem Ovidukt fixiert und mit einer 26g Kanüle unterhalb der Pinzette perforiert. In diese Öffnung wird die Kapillare mit den injizierten Zygoten (ca. 10 Zygoten/Uterushorn in 10-20 µl M16-Medium) eingeführt und die Embryonen mit leichtem Druck über den Schlauch an der Kapillare in das Lumen des Uterus gespült. Die Arterienklemme wird entfernt und der Uterus mit Ovar, Ovidukt und Fettkörper reponiert. Der Hautschnitt wird mit einer Wundklemme versorgt, und die Mäuse bis zum Aufwachen aus der Narkose in Kleenex-Tücher gewickelt und unter einer Rotlichtlampe vor Unterkühlung geschützt.

### **4.3 Antikörper**

#### **4.3.1 Herstellung von Antikörper-Kulturüberständen**

Antikörper sezernierende Hybridomzellen werden in 500ml Vollmedium mit 10% FKS in Rollerflaschen bei 37°C inkubiert. Je nach Wachstumsverhalten werden die Zellen nach 5-7 Tagen abzentrifugiert und die Überstände filtriert (0.22µm-Filter, Millipore, Bedford, USA). Alternativ dazu können die Hybridome auch in Miniperm-Modulen (Heraeus Instruments) für ca. 3 Wochen hochgezogen werden. Dabei wachsen die Zellen in sogenannten Produktionsmodulen in hoher Dichte in einem Volumen von 40 ml. Der produzierte Antikörper bleibt in diesem Produktionsmodul und erreicht eine sehr hohe Konzentration. Die Produktion erfolgte nach dem Protokoll zu den Miniperm-Modulen in einen speziellen Inkubator von Heraeus. Nach Zugabe von Natriumazid (0.1% Endkonzentration) können die so gewonnenen Überstände direkt für Immunfärbungen verwendet oder aufgereinigt werden.

#### **4.3.2 Aufreinigung von Antikörperüberständen**

Mausantikörper, die an Protein A binden, werden über eine Protein A-Sepharose Säule (Pharmacia) aufgereinigt. Dazu läuft der Antikörperüberstand bei 4°C über die Säule. Die Säule wird anschließend mit PBS gewaschen. Gebundene Antikörper werden mit 0.1M Glycin/0.1M NaCl pH3.2 eluiert. 1ml-Fractionen werden in Eppendorfröhrchen aufgefangen.

Die OD-Messung bei 280nm erlaubt die Bestimmung des Proteingehaltes. Fraktionen mit einer  $OD_{280} > 0.14$  (= 0.1mg/ml) werden gepoolt und gegen PBS ÜN dialysiert. Nach der Dialyse wird der Antikörpergehalt erneut bestimmt. Aus dem Wert der OD bei 280nm dividiert durch 1.4 errechnet sich der Proteingehalt in mg/ml.

#### **4.3.3 Biotinylierung von Antikörpern**

Aufgereinigte Antikörper in PBS werden über Nacht bei Raumtemperatur mit Bioton-X-NHS (Biotinyl- $\epsilon$ -amino-caproic-acid-N-hydroxy-succinimide-Ester; Calbiochem) unter Schütteln inkubiert. Pro mg Antikörper gibt man 100 $\mu$ g Biotin gelöst in Dimethylformamid (Stammlösung, 1mg/ml frisch angesetzt) zu. Nichtgebundenes Biotin wird mittels Dialyse gegen PBS ÜN entfernt. Zur Haltbarkeit werden den Antikörpern 0,1%  $NaN_3$  zugesetzt.

#### **4.3.4 FITC-Kopplung von Antikörpern**

Es wird direkt vor dem Verarbeiten 1mg/ml FITC (Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugat; Sigma) in DMSO gelöst. Zu 1mg aufgereinigtem Antikörper in 1ml PBS werden 28 $\mu$ l  $Na_2CO_3$ -Puffer (7,5%; pH 8,5) gegeben und gevortext. Dann wird 100 $\mu$ l von der FITC/DMSO-Lösung dazugegeben und für 1h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Abtrennung von nicht gebundenem FITC erfolgt über Gelfiltration mit einer PD-10-Säule (Pharmacia-Biotech). Diese wird erst mit 15 ml PBS gewaschen. Dann wird der Antikörper-FITC-Mix auf die Säule aufgetragen und mit jeweils 1ml PBS nachgespült. Die erste, untere gelbe Bande stellt den gekoppelten Antikörper dar. Diese wird zu mehreren kleinen Aliquots aufgefangen und die stark gelben Aliquots werden vereint. Zur Haltbarkeit werden den Antikörpern 0,1%  $NaN_3$  zugesetzt.

### **4.4 Zellen**

#### **4.4.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die einzufrierenden Zellen einer konfluenten Platte werden trypsinisiert, der Trypsinverdau mit 2 Vol. serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert (3 min, 1500 Upm). Das Zellpellet wird in 400 $\mu$ l/Kryoröhrchen gekühltes Medium resuspendiert und in gekühlte Kryoröhrchen, in die 400  $\mu$ l gekühltes 2x Einfriermedium (Vollmedium der jeweiligen Zellen mit 20% DMSO) (4°C) vorgelegt sind, aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden kurz gemischt und auf -80°C weggefroren. Zur langfristigen Lagerung werden die Zellen von -80°C in einen Tank mit Flüssigstickstoff transferiert. Zum Auftauen werden die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff entnommen und unter Schwenken in einem 37°C zügig aufgetaut. Die Zellen werden in 5 ml Medium überführt, abzentrifugiert (1200 rpm, 8 min.) und in Medium resuspendiert.

#### **4.4.2 Aufreinigung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)**

Den Versuchstieren wird durch einen Schnitt in die Schwanzvene 300-400 $\mu$ l Blut entnommen. Die Tiere werden dafür drei bis fünf Minuten unter Rotlicht erwärmt, um die Durchblutung anzuregen. Das Blut wird direkt in 500  $\mu$ l heparinhaltigen FACS-Puffer (5U/ml) reinge-

tropft. Das Blut-Heparinmisch wird direkt auf ca. 3ml Lymphoprep (Nycomed) gegeben und 20min bei 700 x g zentrifugiert. Die Lymphozyten werden aus der Interphase entnommen und können nach Waschen in 800µl FACS-Puffer für FACScan-Färbungen oder Zellkulturexperimente verwendet werden.

#### **4.4.3 Einzelzellsuspensionen aus Milz oder Lymphknoten**

Milz (zerschnitten) und/oder Lymphknoten werden durch sterile Metallsiebe gedrückt und mit 5-10ml DPBS nachgewaschen. Nach Zentrifugation (1400rpm, 8min, 4°C, Minifuge 2, Heraeus) wird der Überstand verworfen und das Zellsediment in DPBS/2% FKS, Medium oder FACS-Puffer aufgenommen.

#### **4.4.4 Depletion von B-Zellen aus Einzelzellsuspensionen**

Um B-Zellen aus den Einzelzellsuspensionen zu entfernen, werden die Zellen in 2-5ml DPBS aufgenommen und mit 1 ml Ziege anti-Maus-IgG-Antikörper, der an magnetische Partikel gebunden ist, bei 4°C 20 min. unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden, die an Partikel gebundenen Zellen, mit Hilfe eines Magneten abgetrennt (3-5 min.). Im Überstand befinden sich die depletierten Zellen. Dieser Vorgang wird je nach erwünschtem Abtrennungsgrad zwei- bis viermal wiederholt. Nach dem Waschen wurde die Aufreinigung der Zellen in der FACScan-Analyse überprüft.

#### **4.4.5 Depletion von Zell-Subpopulationen mit Dynabeads**

Für die hier durchgeführten Experimente sollten die Responder-Zellpopulationen von MHC-Klasse II positiven Zellen depletiert werden. Dazu wurden die Einzelzellsuspensionen zuerst 3-4x B-Zell-depletiert (siehe oben). Dann wurden die Zellen in 1ml einer sterilfiltrierten Antikörper-Lösung (20µg/ml MKS4 oder 10-2-16 in DPBS 3%FCS) aufgenommen und 20 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 3ml DPBS/3%FCS und 80µl Dynabeads Ziege anti Maus aufgenommen und für 20 min unter schütteln bei 4°C inkubiert. Nach entfernen der an die Beads gekoppelten Zellen mit dem Magneten (5 min), wurden nochmals 50µl Dynabeads auf die Zellen gegeben und der obige Schritt wiederholt.

#### **4.4.6 Proliferationsexperimente**

Aus Milzen und/oder Lymphknoten werden steril Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die lebenden Lymphozyten werden in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt (Anfärbung toter Zellen durch Trypanblau). Die APC's werden durch radioaktive Bestrahlung (2000 Rad bzw. 20 Gray) an der Proliferation gehindert. Alle Proliferationsexperimente wurden in 96-well-Platten in Triplikaten angesetzt.

**Nachweis von IL-2 mit CTTL-2 Zellen:** Die Zellen wurden 3 x gewaschen um IL-2 aus dem Haltemedium zu entfernen. Es wurden je  $1 \times 10^4$  Zellen in 50µl in ein Well einer 96-well Platte gegeben. Darauf wurden 100µl des zu testenden Zellüberstandes gegeben. Dieser Überstand wurde vorher eingefroren und aufgetaut um eventuell übrige Zellen zu töten. Nach 18h bei 37°C wurden 50µl Medium, versetzt mit  $^3\text{H}$ -Thymidin (20µCi/ml) zugegeben (= 1µCi/well). Nach weiteren 6h Inkubation wurde die Platten mittels Betaplate-Harvester

(TOMTEC) geerntet und die eingebaute Radioaktivität mit dem Betaplate-Counter (Wallac 1205) bestimmt.

**Direkter Proliferationsnachweis:** Wenn die Aktivierung, bzw. die Proliferation von primären T-Zellen (TCR.Tg4) bestimmt werden sollte, so wurde 24h nach Ansetzen des Proliferationsexperimentes 25µl Medium, versetzt mit  $^3\text{H}$ -Thymidin (20µCi/ml) (= 0,5 µCi/well), zugegeben, und der Einbau nach 18-24h bestimmt.

#### 4.4.7 Gewinnung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkszellen

Die Gewinnung der Knochenmarkszellen, sowie die Differenzierung zu Dendritischen Zellen (BM-DC's) wurden angelehnt an ein Protokoll von (Lutz et al., 1999) durchgeführt:

**Knochenmark:** Es wurden Femur und Tibiae der Hinterbeine sorgfältig von Sehnen und Muskelfleisch befreit. Die Knochen wurden zur Sterilisierung für ca. 20 Sek in 70% Ethanol getaucht und danach in PBS gegeben. Beide Enden der Knochen wurden abgeschnitten und dann der das Knochenmark mit ca. 2 ml PBS mittels einer 30G-Kanüle ausgespült. Die Zellsuspension wurde mit einer 1 ml Pipette pipettiert um Zellklumpen aufzulösen.

**Dendritische Zellen (DC):** Die Zellen wurden 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und dann in 10 ml GM-CSF haltigem Medium resuspendiert. Es wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen auf eine 10 cm-Bakterien-Petrischale in 10ml Medium plattiert und bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert (Tag 0). Am Tag 3 wurde 10 ml frisches Medium zu den Platten gegeben. Am Tag 6 wurden je 10 ml Überstand der Zellen abgenommen, dieser zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde vorsichtig zu den Petrischalen zurückgegeben. Am Tag 8 wurde der Mediumtausch von Tag 6 wiederholt. Die Dendritischen Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in Suspension oder sind nur leicht am Boden angeheftet. Die sich auch bildenden Makrophagen sind fest adhärent am Boden.

**Aktivierung:** Zur Aktivierung von Dendritischen Zellen wurde LPS (1µg/ml) am Tag 9 zu den Platten pipettiert. Die so aktivierten BM-DC's wurden am Tag 10 für die Proliferationsversuche eingesetzt.

#### 4.4.8 Markierung von TCR.Tg4-Zellen mit CFSE

CFSE (5,6-Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidyl-Ester) liegt als 5M Stammlösung in DMSO vor und wird bei -20°C trocken und dunkel gelagert. Zur Markierung von Zellen, die in Mäuse injiziert werden sollen, wird pro ml Zellsuspension ( $1 \times 10^7$ /ml) in vorgewärmten RPMI (+Glutamin/+Pen/Strep/ kein FCS) 1µl der Stammlösung zugegeben und die Zellen im Dunkeln 10 min bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen 4 mal im obigen Medium jedoch eiskalt und mit 10% FCS gewaschen. Danach werden die Zellen in DPBS aufgenommen und i.v. injiziert. Sollen Zellen für in vitro Versuche markiert werden, muß nur 1/10 der Stammlösung benutzt werden. Die hier verwendeten Einzelzellsuspensionen waren 3mal B-Zell depletiert, und zusätzlich depletiert von MHC-Klasse II-positiven Zellen mit dem Antikörper 10-2-16 und magnetischen Beads gekoppelt an Ziege anti Maus-Antikörper.

## 4.5 Durchflußzytometrie

Zum Nachweis der Expression von Oberflächenmolekülen werden die zu testenden Zellen geerntet (Zellkultur), eine Einzellellsuspension hergestellt, oder PBL's aus Blut gewonnen. Es werden für jede Färbung  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Die meisten Färbungen wurden mit  $2 \times 10^5$  oder  $5 \times 10^5$  Zellen durchgeführt. Die Zellen werden gezählt (nicht bei PBL's) und entsprechend verdünnt. Die gewünschte Menge Zellen wird auf eine 96 well-Platte pipettiert und nach 1 min Zentrifugieren (2000 rpm) wird das Zellpellet in Antikörperlösung aufgenommen. Zur Blockierung von unspezifischer Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren werden die Zellen vor dem Färben mit einem Antikörper gegen CD16 und CD32 (Fc-Block) behandelt (15 min  $4^\circ\text{C}$ ). Nach dem Waschen (+150µl FACS-Puffer +Zentrifugation) folgt die Färbung in 25 oder 50µl Antikörperverdünnungen in FACS-Puffer bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln für 10-20 min. Wird ein biotinylierter Erstantikörper verwendet, erfolgt nach dem Waschen die Inkubation mit einem Sekundärreagenz (Streptavidin-Red670 bzw. -PE oder -FITC) für 10 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$ . Nach erneutem Waschen werden die Zellen in 200µl FACS-Puffer aufgenommen. Wenn keine mit SA-Red670 oder Red613 gekoppelten Antikörper verwendet werden, können die Zellen am Ende in 200µl Propidium-Iodid (1µg/ml in FACS-Puffer) aufgenommen werden. Die PI-positiven Zellen sind tote Zellen und werden bei der FACS-Analyse elektronisch ausgeschlossen. Die gefärbten Zellen werden mit einem FACScan Durchflußzytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg) gemessen und die Daten anschließend mit Hilfe der Software Cell-Quest oder WinMDI 2.8 analysiert. Die logarithmischen Einheiten beider Achsen der Dotblots stellen immer die Fluoreszenzintensität dar. Bei Histogrammen ist in der X-Achse logarithmisch die Fluoreszenzintensität, und in der Y-Achse die Anzahl der Zellen aufgetragen.

## 4.6 EAE-Induktion

Die aktive EAE-induktion erfolgte nach Protokollen von (Liu et al., 1995) und (Coligan, 1994). Es wurde IFA (Inkomplettes Freund's Adjuvants; Difco) mit abgetöteten *M.tuberculosis* (Stamm H37 RA; Difco) in einer Konzentration von 4mg/ml versetzt und mittels Ultraschall so weit wie möglich gelöst. Das autoantigene Peptid Ac1-10 (4K) wurde in DPBS in einer Konzentration von 4mg/ml aliquotiert und auf  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zur Immunisierung wurde eine Emulsion aus gleichen Anteilen IFA (4mg/ml *M.tuberculosis*) und Peptid 4 mg/ml zubereitet. Dazu wurde jede Lösung getrennt in Spritzen aufgenommen und mittels eines Adapters für beide Spritzen mit einem kleinen Verbindungsloch (27G) dazwischen vermischt bis zur Bildung einer weißen, festen Emulsion. Davon wurde je 0,1ml in die Schwanzbasis einer Maus gespritzt (Tag 0) Somit erhielt jede Maus 200µg Peptid in IFA/DPBS-Emulsion mit 2mg/ml *M.tuberculosis*. Am Tag 1 und 3 wurden jeder Maus 200ng Pertussistoxin in 500µl DPBS i.p. injiziert. Die Mäuse wurden ab Tag 5 in den ersten 4 Wochen täglich und dann alle 2-3 Tage nach Zeichen von EAE untersucht. Die Bestimmung des klinischen Grades erfolgte nach untenstehender Tabelle. Wenn Tiere starben oder wegen schwerer EAE getötet werden mußten, wurden sie aus der weiteren Gruppenwertung für die EAE-Kurve herausgenommen. Da dies ein Abflachen der Kurve verursacht, wurde unter der Kurve die Anzahl der Toten und der Todeszeitpunkt angegeben. Die Signifikanzberechnung für das mittlere Maximum sowie

für den Beginn von EAE wurde mit einem zweiseitigem Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen durchgeführt (Students t-Test).

Grad	Klinische Anzeichen
0	Normal, keine offenbaren Krankheitszeichen
1	Gelähmter Schwanz oder Hinterbeinschwäche (Maus stolpert durch Käfigdeckel-Gitterstäbe)
2	Gelähmter Schwanz und Hinterbeinschwäche
3	Partielle Hinterbein-Paralyse (Maus kann nicht mehr normal laufen, jedoch noch zum gewissen Grad die Hinterbeine bewegen, verzögerter Aufstehreflex)
4	Vollständige Hinterbeinparalyse (Maus bewegt sich nur noch mit Vorderbeinen fort)
5	Tot durch EAE oder kurz vor dem Sterben, wird getötet

**Einteilung der klinischen EAE-Symptome.** Übernommen von Current Protocols in Immunology vol.3 (Coligan, 1994):

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Transgene Mäuse zur dominanten Präsentation eines Autoantigens**

In dieser Arbeit sollte ein transgenes Maus-System aufgebaut und charakterisiert werden um die Hypothese zu testen, daß die fötale Expression eines Autoantigens die Autoimmunerkrankung der Mutter positiv beeinflussen kann. Dazu sollte eine transgene Mauslinie kreiert werden, welche die dominante Präsentation des Autoantigens durch den Fötus erlaubt. EAE als Mausmodell für MS wurde als Autoimmunerkrankung ausgewählt.

Da bestimmte Toleranzmechanismen bedingt durch das homogene T-Zellrepertoire am besten in TCR-transgenen Tieren zu beobachten sind, und die EAE-Induktion schneller und zuverlässiger in TCR-transgenen Mäusen ist, sollte ein System verwendet werden, in dem EAE sowohl in TCR-transgenen, als auch in Mäusen mit einem wildtyp (wt) T-Zell Repertoire induzierbar ist. Die verschiedenen, verfügbaren TCR-transgenen Linien sind alle spezifisch für das N-terminal acetylierte MBP-Peptid (Ac1-10), gebunden an I-A<sup>u</sup> (Goverman et al., 1993; Lafaille et al., 1994; Liu et al., 1995). Da die Linien von (Liu et al., 1995) keine spontane EAE zeigen, sollte eine dieser Linien verwendet werden. Von David Wraith wurde uns freundlicherweise die Linie "TCR.Tg4" zur Verfügung gestellt. Die zu erstellende neue transgene Linie sollte daher das Autoantigen MBP 1-10 kovalent gebunden an die  $\beta$ -Kette des MHC-Klasse II Moleküls I-A<sup>u</sup> exprimieren. Da das wildtyp MBP-Peptid nur eine relativ geringe Affinität zu I-A<sup>u</sup> hat und daher eher von der Invarianten Kette oder anderen Maus-Peptiden verdrängt wird, sollte auch ein Peptid mit höherer Affinität, MBP Ac1-10 (4Y) (Fairchild et al., 1993), als Autoantigen verwendet werden. Zur Bestimmung der Expressionsstärke des Transgenes mittels FACS, sollte auch eine transgene I-A<sup>u</sup> $\alpha$ -Kette eingeführt werden.

Um eine Verdrängung des Peptides durch die Invariante Kette zu vermeiden, sollten die transgenen Mäuse auf den Invariante Kette Knockout-Hintergrund (Ii-ko) zurückgekreuzt werden.

#### **5.1.1 Herstellung der DNA-Konstrukte für transgene Mäuse**

Die Transgen-Konstrukte wurden im wesentlichen wie das Transgen-Konstrukt aus (Ignatowicz et al., 1995) aufgebaut. Hierbei wurden das Peptid und die Linkersequenz zwischen die 3. und 4. Aminosäure der I-A $\beta$ -Kette, nach der Signalsequenz (Leader), eingefügt. Die ersten drei Aminosäuren der reifen I-A $\beta$ -Kette sind wichtig für die kotranslationale Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase im ER. Der Linker besteht aus 15 Aminosäuren wobei immer auf 4 Glycinreste ein Serinrest folgt.

Als MHC Klasse II Promoter wurde der humane DR $\beta$ 51-Promotor verwendet, da dieser verlässlich MHC-Klasse II-spezifische Expression in vorhergehenden transgenen Mausmodellen zeigte (Fukui et al., 1997; Yamamoto et al., 1994). Dieser Promotor, sowie der Vektor pDR51, der zur Konstruktion der Transgene verwendet wurde, wurde freundlicherweise von Yoshinori Fukui zur Verfügung gestellt. Die Klonierung des  $\beta$ -Ketten Konstruktes erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in (Fukui et al., 1997) beschrieben.



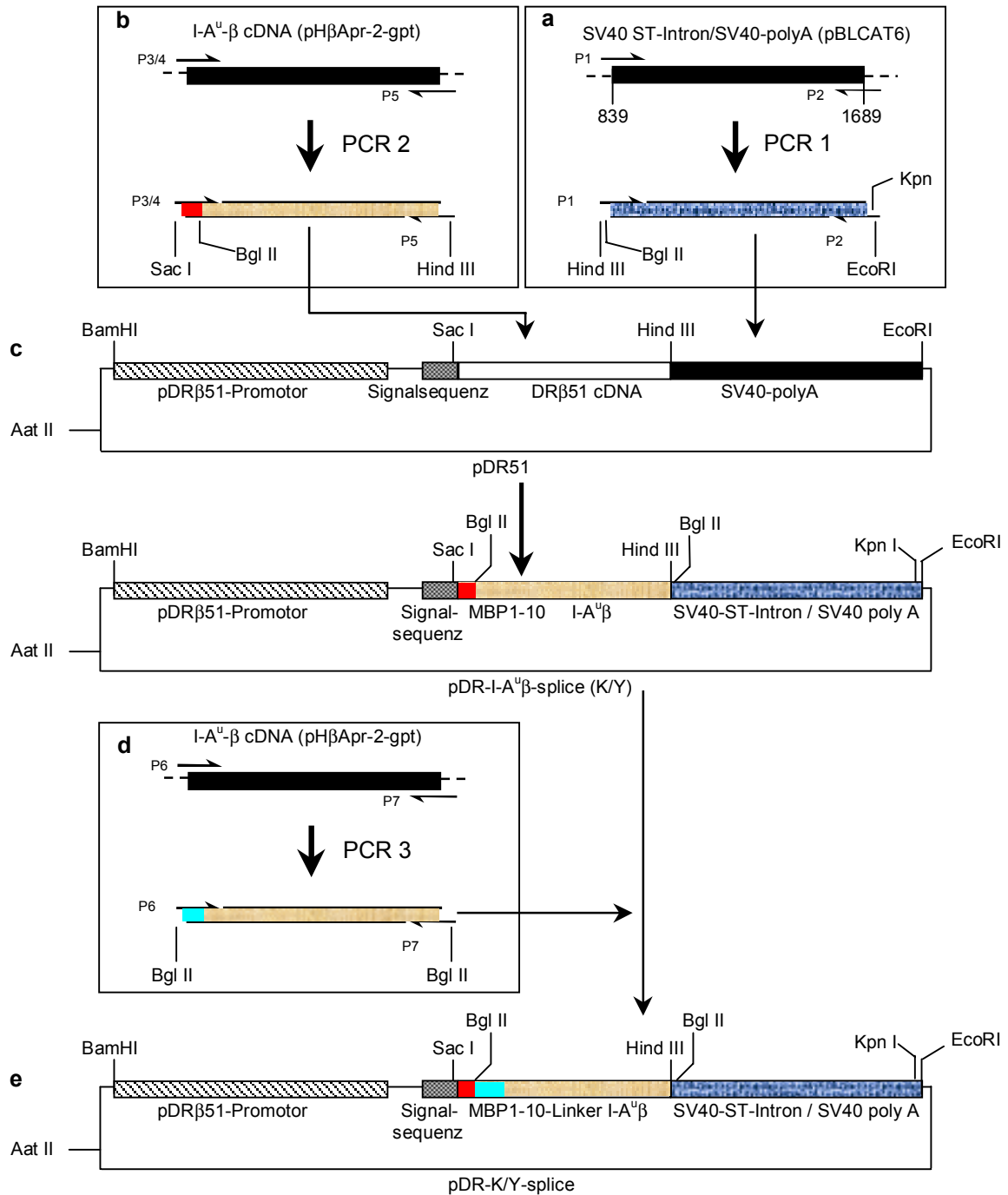
β-Ketten Konstrukte (siehe Abb. 4 und 6):

Da der Vektor pDR51 keine Intron-Sequenzen aufwies, diese aber wichtig für eine effektive Expression von Transgenen sind (Brinster et al., 1988; Whitelaw et al., 1991), wurde die SV40-Splice Poly A-Sequenz über PCR aus dem Vektor pBLCAT6 gewonnen, und mit der SV40-Terminationssequenz von pDR51 ausgetauscht. Mit einer zweiten PCR wurden ein Teil der Signalsequenz, das Peptid sowie die Restriktionsschnittstellen Sac I, Bgl II und Hind III in die I-A<sup>u</sup> cDNA eingefügt und damit die cDNA für DRβ51 aus pDR51 ausgetauscht. Mit 2 unterschiedlichen 5' Primern wurden die zwei unterschiedlichen Peptide (wt=4K und 4Y) eingefügt. Die N-terminale Acetylierung des Peptides ist wichtig für die Bindung an I-A<sup>u</sup> und für die Induktion von EAE. Da eine Acetylierung des N-Terminus nur im Zytosol erfolgt (Bei MBP Abspaltung von Methionin mit darauffolgender Acetylierung), und die ersten drei Aminosäuren der β1-Domäne von I-A<sup>u</sup>β (GDS) noch N-terminal vor dem Peptid liegen mußten, mußte die Acetylgruppe durch eine sterisch ähnliche Gruppe ersetzt werden. Der Aminosäurerest Glycin weist eine ähnliche Struktur auf. Zudem konnte das T-Zell-Hybridom 1934.4, das spezifisch für I-A<sup>u</sup> +MBP (Ac1-10) ist, aktiviert werden durch ein azido-Nitrobenzoyl gekoppeltes Peptid mit den Aminosäuren Tyrosin und Glycin N-terminal vor der MBP-Sequenz ohne eine Acetylierung (Wraith et al., 1989). Daher wurde Glycin noch vor die Peptidsequenz gesetzt. Mit einer weiteren PCR wurde die Linkersequenz und zwei Bgl II Restriktionsschnittstellen in die I-A<sup>u</sup> cDNA eingefügt und diese in das vorher generierte Konstrukt eingefügt. Die daraus entstandenen Konstrukte pDR-K-splice und pDR-Y-splice (siehe Abb. 4) sind folgendermaßen aufgebaut: Nach dem DRβ51 Promotor folgt die DRβ51 Signalsequenz, danach die ersten drei Aminosäuren von I-A<sup>u</sup> β1, dann Glycin als Ersatz für die Acetylierung, das Peptid MBP1-10 (Maus), gefolgt von der Linkersequenz und dann I-A<sup>u</sup>β ab der 4. Aminosäure. Nach dem Stopkodon folgt direkt die Sequenz für das SV40-ST Intron sowie den Transkriptionsstop und die Polyadenylierung.

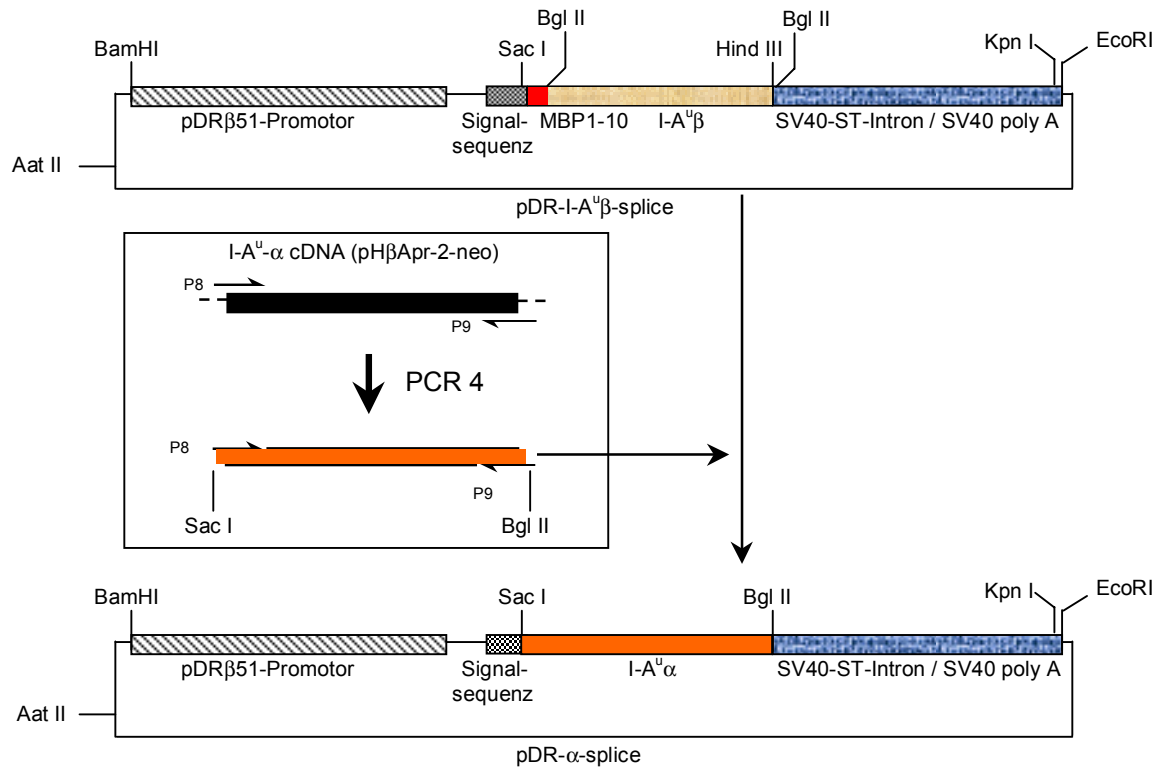
α-Ketten Konstrukt (siehe Abb. 5 und 6):

Die I-A<sup>u</sup>α-Kette sollte auch unter demselben Promotor wie die β-Kette exprimiert werden. Die Sequenzinformation für I-A<sup>u</sup>α war erst ab der 6. Aminosäure nach der Signalsequenz bekannt. Da die sequenzierten I-Aα-Ketten in diesem Bereich alle dieselbe Aminosäuresequenz haben (Benoist et al., 1983), wurden die ersten 5 Aminosäuren durch die analoge Sequenz von I-A<sup>k</sup>α ersetzt. Die ersten Aminosäuren von I-A<sup>k</sup>α haben nicht die Sequenz GDS wie in I-A<sup>u</sup>β. Daher wurde auch ein Teil der pDRβ51 Signalsequenz durch die letzten 5 Aminosäuren der I-A<sup>k</sup>α-Signalsequenz ersetzt (siehe Abb. 6 Primer: I-A<sup>u</sup>-alpha-Up). Dies ergab somit eine gemischte Signalsequenz zwischen DRβ51 und I-A<sup>k</sup>α. Mittels PCR wurden die oben beschriebenen Elemente, sowie die Restriktionsschnittstellen Sac I und Bgl II in die I-A<sup>u</sup>α-cDNA eingefügt, und damit die I-A<sup>u</sup>β-Sequenz aus dem Vektor pDR-I-A<sup>u</sup>β-splice ersetzt (siehe Abb. 5).

Dies ergab ein Konstrukt mit dem DRβ51 Promotor gefolgt von der DRβ51 Signalsequenz, bei der die letzten 5 AS durch AS der I-A<sup>k</sup>α-Signalsequenz ersetzt sind, danach die ersten 5 Aminosäuren von I-A<sup>k</sup>α, dann I-A<sup>u</sup>α ab der 6. Aminosäure. Nach dem Ende der I-A<sup>u</sup>α-cDNA folgt direkt die Sequenz für das SV40-ST Intron sowie den Transkriptionsstop und die Polyadenylierung.



**Abb. 4: Klonierungsstrategie für die β-Ketten-Konstrukte.** **a)** Über PCR wurde die Sequenz für das Intron des kleinen T-Antigens (ST) und die Polyadenylierung (Poly A) von SV40 aus dem Expressionsvektor pBLCAT6 gewonnen. **b)** Über PCR wurde die Sequenz für die I-A<sup>u</sup>-β-cDNA aus dem Expressionsvektor pHβApr-2-gpt gewonnen und die MBP-Peptide (siehe Primer) eingefügt. **c)** Beide durch PCR gewonnenen Fragmente wurden sequentiell über die durch die Primer eingebrachten Restriktionsschnittstellen in den Vektor pDR51 eingefügt und ersetzen die darin enthaltene cDNA (DRβ51) und die SV40-PolyA-Sequenz (pDR-I-A<sup>u</sup>-β-splice (K/Y)). **d)** Über PCR wurde die Sequenz für die I-A<sup>u</sup>-β-cDNA aus dem Expressionsvektor pHβApr-2-gpt gewonnen und die Linkersequenz (siehe Primer) eingefügt. **e)** Das in (d) gewonnene PCR-Fragment wurde in die Bgl II-Restriktionsschnittstellen von pDR-I-A<sup>u</sup>-β-splice (K/Y) eingesetzt. Die fertigen Transgen-Konstrukte pDR-K-splice und pDR-Y-splice wurden mit Aat II und Kpn I linearisiert und für die Injektion eingesetzt.



**Abb. 5: Klonierungsstrategie für das  $\alpha$ -Ketten-Konstrukt.** Über PCR wurde die Sequenz für die I-A<sup>u</sup> $\alpha$ -cDNA aus dem Expressionsvektor pH $\beta$ Apr-2-neo gewonnen und Sequenzen von der I-A<sup>k</sup>-Signalsequenz (siehe Primer in Abb. 6) eingefügt. Das durch PCR gewonnen Fragment wurde in die Restriktionsschnittstellen Sac I und Bgl II von pDR-I-A<sup>u</sup> $\beta$ -splice eingesetzt. Dies ergab eine gemischte Signalsequenz aus DR $\beta$ 51 und I-A<sup>k</sup> $\alpha$ . Das fertige Transgen-Konstrukt pDR- $\alpha$ -splice wurde mit Aat II und Kpn I linearisiert und für die Injektion eingesetzt.

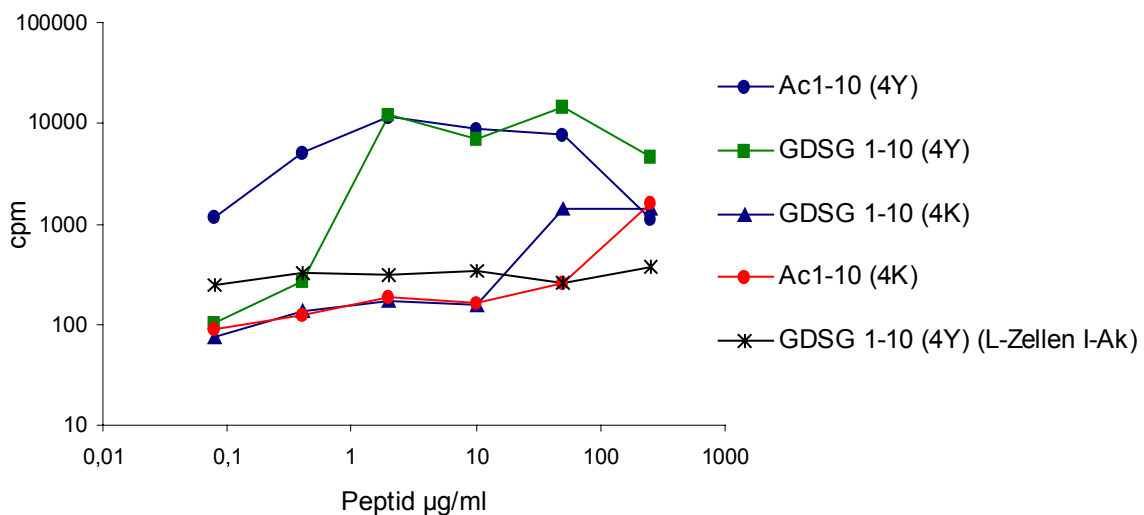
Primer	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
P1	SV40-Up	Hind III      Bgl II TAAGAAATTCAGCTTAGATCTGATCTTTGTGAAGGAACC
P2	SV40-down-new	EcoRI      Kpn I AATAAGCTTGAATTCGGTACCCGGGGATCGATCCAGACAT
P3	Up Primer B (K)	Sac I      Ear I      Bgl II TAAGAAATTCGAGCTCCCACTGGCTTTGGCTGGAGACTCCGGCGCATCACAGAGAGATCTGAAAGGCCATTTCTTGGTCCAG S S P L A L A G D S G A S Q K R P S Q R S E R H F L V Q Ende der DRβ51-Signalsequenz    I-A <sup>u</sup> β <sub>1-3</sub> mMBP <sub>1-10</sub> I-A <sup>u</sup> β <sub>4-9</sub>
P4	Up Primer B (Y)	Sac I      Bgl II TAAGAAATTCGAGCTCCCACTGGCTTTGGCTGGAGACTCCGGCGCATCACAGAGAGATCTGAAAGGCCATTTCTTGGTCCAG S S P L A L A G D S G A S Q Y R P S Q R S E R H F L V Q Ende der DRβ51-Signalsequenz    I-A <sup>u</sup> β <sub>1-3</sub> mMBP <sub>1-10</sub> (4Y)      I-A <sup>u</sup> β <sub>4-9</sub>
P5	Primer Down	Hind III      Pst I ATTGGATCCAAGCTTTCACTGCAGGAGCCCTGCTGG • Stop    Ende von I-A <sup>u</sup> β
P6	Up Primer C new	Bgl II      Bam HI GCGGAATTCAGATCIGGAGGIGGTGGATCCGGTGGAGGAGGGAGIGGCCGGAGGAGGAAAGGCCATTTCTTGGTCCAG R S G G G G S G G G S G G G S E R H F L V Q mMBP <sub>9-10</sub> Glycin-Serin-Linker      I-A <sup>u</sup> β <sub>4-9</sub>
P7	Primer Down New	Bgl II      Hind III      Pst I ATTGGATCCAGATCTAAGCTTTCACTGCAGGAGCCCTGCTGG • Stop    Ende von I-A <sup>u</sup> β

P8	I-A <sup>u</sup> -alpha-Up	<div><div>Sac I</div><div>TAAGAAATTCGAGCICCCCACTCAGCCICTGCGGAGGTGAAGACGACATTTAGAGCCCGACCAITGIAGGC</div><div><div>DRβ51-Signalsequenz</div><div><div>S S P L S L C G G E D D I E A D H V G</div><div>Ende der I-A<sup>K</sup><sub>α</sub> Signalsequenz</div></div><div><div>I-A<sup>K</sup>-α<sub>1-5</sub></div><div>I-A<sup>u</sup>-α<sub>6-10</sub></div></div></div></div>
P9	I-A <sup>u</sup> -alpha-down	<div><div>Bgl II EcoRI</div><div>TAAGGATCCAGATCTGAATTC</div><div><div>I-A<sup>u</sup>-α<sub>6-10</sub></div></div></div>

**Abb. 6: Sequenzen der für die Klonierung eingesetzten Primer.** Primersequenz mit den wichtigen Restriktionsschnittstellen, die durch die Primer eingebracht werden. Der graue Bereich bezeichnet die in der PCR hybridisierende Sequenz. Die Buchstaben unter der Primersequenz bezeichnen die Proteinsequenz im fertigen Konstrukt. Darunter sind die jeweiligen funktionellen Proteinbereiche beschrieben. Die "Bezeichnung" bezieht sich auf die während der Klonierung verwendeten Namen, während P1-P9 sich auf die Primerbezeichnung in Abb.4 und 5 beziehen.

### 5.1.2 N-terminal veränderte MBP-Peptide binden an I-A<sup>u</sup>

Die MBP-Peptidsequenz in den Transgenkonstrukten ist am N-Terminus um die 4 Aminosäuren GDSG erweitert, wobei das letzte Glycin, die für die Bindung an I-A<sup>u</sup> wichtige Acetylierung (Wraith et al., 1989), ersetzt. Eine wichtige Vorbedingung für die Generierung der transgenen Mäuse war zu testen, ob diese Sequenz überhaupt an I-A<sup>u</sup> bindet, und den, in den TCR.Tg4 verwendeten, TCR aktivieren kann. Daher wurde ein Aktivierungsexperiment mit dem T-Zell Hybridom 1934.4 durchgeführt. (Abb. 7).



**Abb. 7: Die Peptidsequenz der transgenen Konstrukte kann an I-A<sup>u</sup> binden und das T-Zell Hybridom 1934.4 aktivieren.** Das T-Zell-Hybridom 1934.4 ( $5 \times 10^4$  Zellen) wurde mit I-A<sup>u</sup>-transfizierten und I-A<sup>u</sup> negativen L-Zellen (je  $5 \times 10^4$ ) mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Peptide 24h inkubiert. Die Aktivierung des Hybridoms wurde mittels IL-2 abhängigen CTLL-2 Zellen bestimmt (siehe Methoden). Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. Ac1-10: MBP 1-10 acetyliert; (4K)(4Y) = Aminosäure an Position 4 des Peptides; GDSG: N-terminale Sequenz vor MBP1-10 in den transgenen Konstrukten.

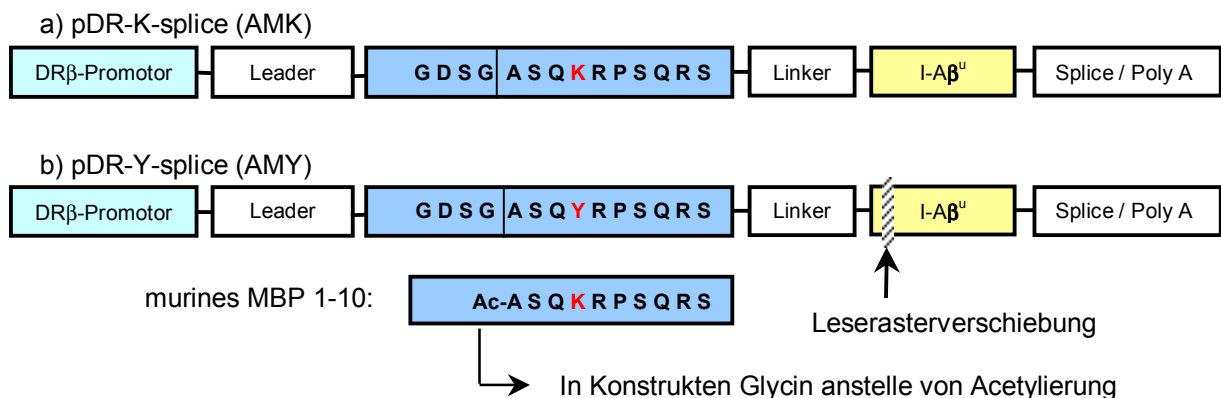
Das Experiment zeigt, daß die Peptide, die in der Sequenz den Peptiden der Transgenkonstrukten entsprechen, an I-A<sup>u</sup> auf L-Zellen binden, und das Hybridom 1934.4 ähnlich stark wie die acetylierten Peptide aktivieren können. Die Bindung an I-A<sup>u</sup> ist spezifisch, da die Peptide mit I-A<sup>u</sup> negativen L-Zellen keine Aktivierung des Hybridoms bewirken.

### 5.1.3 Transgene Founder-Linien

Die mit Aat II und Kpn I gewonnen Fragmente der Konstrukte wurden gemischt und für die Gewinnung von transgenen Mäusen koinjiziert. Es wurde dabei das Fragment von pDR $\alpha$ -splice entweder zusammen mit pDR-K-splice oder pDR-Y-splice injiziert. Die dadurch entstandenen Mauslinien wurden AMK (I-A<sup>u</sup>-MBP 1-10 (4K)) bzw. AMY (I-A<sup>u</sup>-MBP 1-10 (4Y)) genannt (siehe Abb. 8).

Die Sequenz der Konstrukte wurde mittels Sequenzierung durch eine Firma überprüft. Die Analyse der transgenen Linien AMY zeigten jedoch, trotz eines starken RT-PCR-Signals keine Expression in der FACS-Analyse. Eine spätere Überprüfung des Konstruktes pDR-Y-splice ergab, daß ein Sequenzfehler irrtümlicherweise als Lesefehler interpretiert worden

war. Dies führte durch die Insertion einer Thyminbase im Anfangsbereich der I-A<sup>u</sup>β-cDNA (Kodon für die 8. AS) zu einer Leserasterverschiebung, wodurch ein Peptid mit 88 Aminosäuren entstand. Dieses Peptid besteht am N-Terminus aus der Sequenz GD SG, dem Autoantigen MBP-1-10 (4Y), der Linkersequenz und den AS 4-7 aus I-A<sup>u</sup>β, gefolgt von 55 AS aus der Sequenz der Leserasterverschiebung. Da die AMY-Linien trotz dieser Mutation, durch das freigesetzte Autoantigen, noch einige interessante Phänotypen zeigten (siehe unten), wurde eine der Linien in einigen Experimenten eingesetzt.



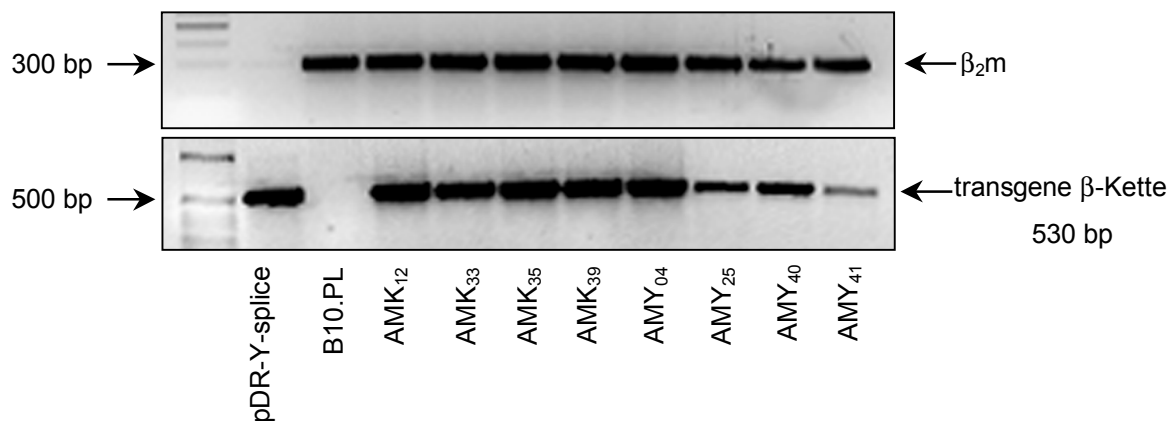
Transgene Mäuse:	Bezeichnung:
pDR-K-splice + pDR-α-splice:	AMK
pDR-Y-splice + pDR-α-splice:	AMY

**Abb. 8: Aufbau-Schema der Konstrukte für die Injektion in Zygoten zur Herstellung transgener Mäuse.** Es wurden jeweils eine α-Kette (pDR-α-splice), sowie eine β-Kette (pDR-K-splice oder pDR-Y-splice) koinjiziert. Durch pDR-K-splice in AMK-Mäusen ist das Wildtyp MBP-Peptid über den Glycin-Linker kovalent an die I-A<sup>u</sup>β-Kette gebunden. In AMY-Mäusen wird durch eine Leserastermutation ein Peptid von 88 AS produziert, das bis zur 7. AS von I-A<sup>u</sup>β im gewünschten Leseraster verläuft. In beiden β-Ketten-Konstrukten ist anstelle der Acetylierung im wt-MBP-Peptid ein Glycin eingefügt. Die drei Aminosäuren GDS zwischen der DRβ-Signalsequenz (Leader) und dem MBP-Peptid sind als die ersten drei Aminosäuren der I-A<sup>u</sup>β-Kette wichtig für die Abspaltung der Signalsequenz. Die I-A<sup>u</sup>β-Kette nach dem Glycin-Linker beginnt somit erst ab der 4. Aminosäure.

Die Founder-Mäuse wurden mittels Southern-Blot von Schwanz-DNA identifiziert (siehe Methoden). Alle Founder waren sowohl für die α-, als auch für die β-Kette positiv. Da diese auch in den folgenden Generationen zusammen weitergegeben wurden, ist anzunehmen, daß beide Ketten in denselben Locus kointegriert wurden. Es gab je 4 positive Founder von AMK bzw. AMY (siehe Abb. 8 und Tabelle 1). Spätere Generationen wurden mittels PCR getestet. In Abb. 9 ist eine PCR mit Schwanz-DNA der Founder gezeigt. Da dies keine quantitative PCR war, ist die unterschiedliche Stärke der Banden nicht unbedingt auf eine unterschiedliche Kopienanzahl zurückzuführen, sondern eher auf eine unterschiedliche Qualität der DNA.

Transgen	Founder-Nr.:	Bezeichnung
AMK	28012	AMK <sub>12</sub>
	28033	AMK <sub>33</sub>
	28035	AMK <sub>35</sub>
	28039	AMK <sub>39</sub>
AMY	41004	AMY <sub>04</sub>
	41025	AMY <sub>25</sub>
	41040	AMY <sub>40</sub>
	41041	AMY <sub>41</sub>

**Tabelle 1: Aufstellung der Foundernummern (Ohrenmarken) und die dazugehörige Bezeichnung.**



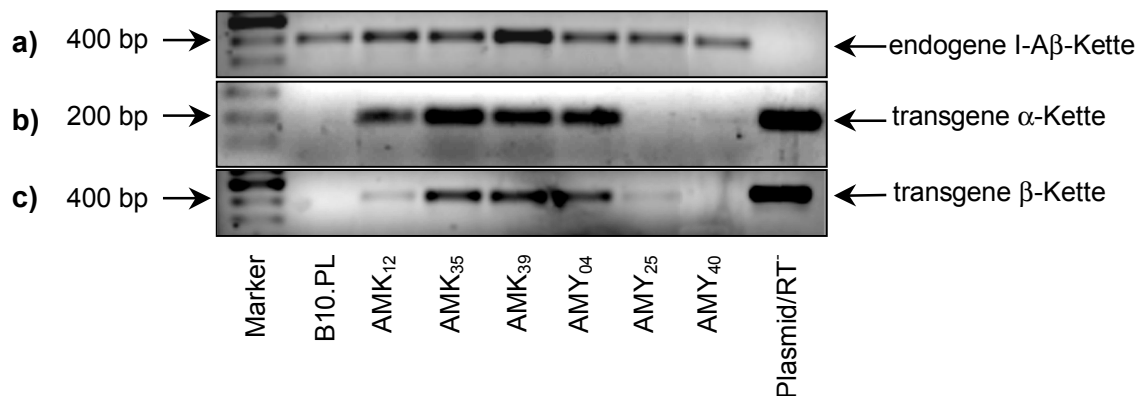
**Abb. 9: PCR von transgener Founder-DNA.** PCR mit genomischer Schwanz-DNA von B10.PL und transgenen Foundern. Als Positiv-Kontrolle wurde das injizierte Plasmid pDR-Y-splice eingesetzt. Das obere Gel zeigt dieselbe DNA mit einer PCR für  $\beta_2m$  als Kontrolle für die DNA-Qualität.

#### 5.1.4 Selektion der transgenen Founder

Die Entscheidung zur Selektion der besten Linien wurde aufgrund der Transgenexpression mit Hilfe von RT-PCR und/oder thymischer Selektion in doppeltransgenen Tieren getroffen. Dazu wurden die verschiedenen Founder-Linien mit TCR.Tg4-Tieren verpaart. Da die Transgene durch den MHC-Klasse II Promotor auch im Thymus exprimiert werden, sollte bei stark exprimierenden Linien in doppeltransgenen Tieren eine ausgeprägte thymische Deletion zu finden sein. Die doppeltransgenen Tiere wurden daher auf thymische Deletion untersucht, und bei einzeltransgenen Nachkommen wurde eine RT-PCR mit Milz-RNA durchgeführt.

Es sind RT-PCR-Daten für alle Linien, außer AMK<sub>33</sub> und AMY<sub>41</sub> gezeigt, da diese Linien schon aufgrund der Daten der negativen Selektion verworfen worden waren (Abb. 10). Die RT-PCR zeigt, daß die Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> sowohl die  $\alpha$ -, als auch die  $\beta$ -Kette am stärksten exprimieren. Die Linie AMK<sub>12</sub> zeigt eine schwache Expression der transgenen  $\beta$ -Kette und eine deutliche Expression der  $\alpha$ -Kette. Die Linien AMY<sub>25</sub> und AMY<sub>40</sub> exprimieren beide transgenen Ketten nur sehr schwach.



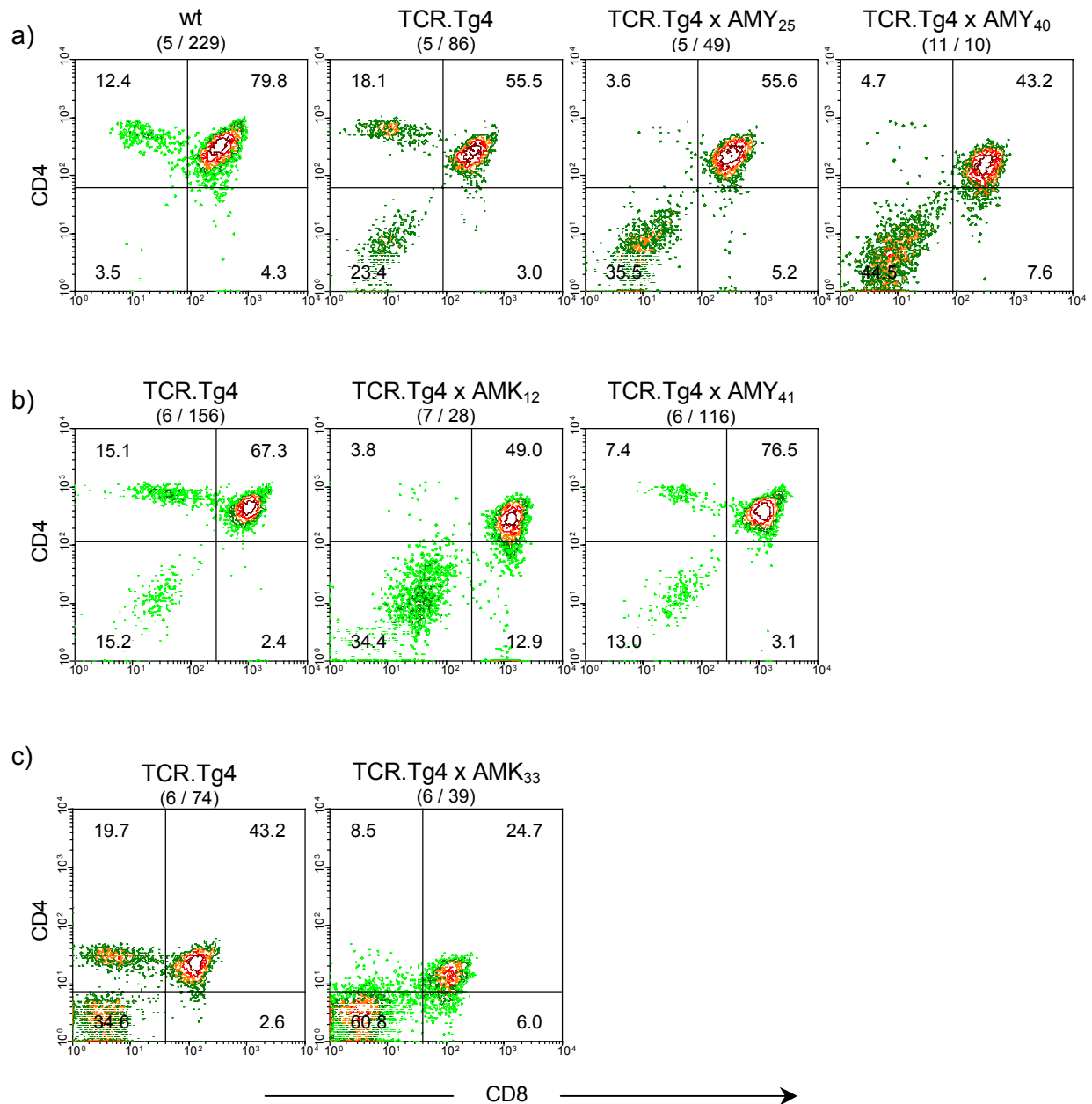


**Abb. 10: RT-PCR von transgenen Milzen.** PCR von cDNA gewonnen aus Milz-RNA. **a)** PCR für die endogene I-Aβ-Kette; In der letzten Bahn ist die RT-Kontrolle von AMY<sub>40</sub> geladen. **b)** PCR für die transgene α-Kette. Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid pDR-α-splice eingesetzt. **c)** PCR für die transgene β-Kette. Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid pDR-Y-splice eingesetzt.

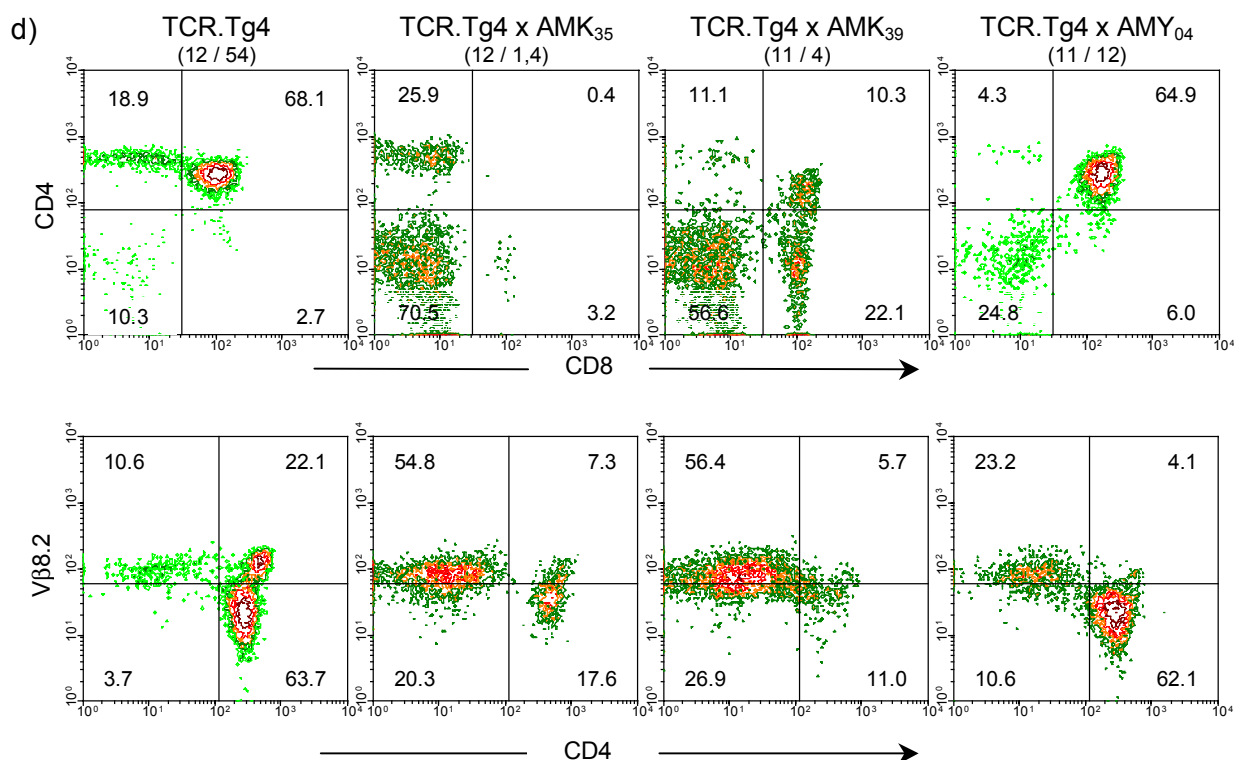
In Abb. 11 ist für alle doppeltransgenen Linien eine Thymozytenfärbung von CD4 gegen CD8 gezeigt. Für die selektionierten Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub>, und AMY<sub>04</sub> ist eine zusätzliche Färbung von CD4 gegen Vβ8.2, der transgenen TCRβ-Kette, gezeigt. Die Daten aus Abb. 11 sowie anderer Experimente, die aus der Analyse von doppeltransgenen Tieren gewonnen wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Sehr auffallend war die geringe Thymusgröße und die stark verringerte Anzahl von Thymozyten in den meisten doppeltransgenen Linien, insbesondere in den Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub>. Die FACS-Analyse zeigte bei den meisten Linien eine starke Verringerung der CD4/CD8 doppelpositiven Thymozyten von ca. 60% in einzeltransgenen TCR.Tg4 Tieren auf bis zu 0,4% in TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>. In allen bis auf in einer Linie war auch der Anteil an CD4-Einzelpositiven Thymozyten deutlich verringert. Die einzige Linie, die davon eine Ausnahmen machte, ist AMK<sub>35</sub>, die einen erhöhten Anteil von CD4-einzelpositiven Thymozyten hat. Allerdings haben diese Zellen keine hohe Expression der transgenen TCR-Vβ8.2-Kette (Abb. 11d). Zudem ist, durch die geringe Thymozytensamtzahl die absolute Anzahl dieser Zellen ( $3,6 \times 10^5$  in TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> versus  $10,3 \times 10^6$  in TCR.Tg4) deutlich geringer. Trotz der Leserastermutation in den AMY-Linien führt die Expression des Transgenes zur Deletion von antigenspezifischen Thymozyten. Dies zeigt, daß das autoantigene Epitop in diesen Mäusen produziert und von endogenen I-A<sup>u</sup>-Molekülen präsentiert wird.

Die Daten in Tabelle 2 zeigen, daß in den doppeltransgenen Linien vor allem der Anteil der CD4-positiven Thymozyten mit hoher Vβ8.2 Expression verringert ist. Alle doppeltransgenen Tiere hatten eine verringerte Anzahl an peripheren Vβ8.2 positiven CD4-Zellen (z.B. in Lymphknoten). Die Verringerung korrelierte mit dem Grad der negativen Selektion im Thymus, so hatten TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Mäuse durchschnittlich 7% und TCR.Tg4 x AMK<sub>41</sub> durchschnittlich 27% Vβ8.2 positive CD4-Zellen im Vergleich zu ca. 40% in TCR.Tg4.

**Abb. 11: Thymische Deletion in doppeltransgenen Tieren.** Thymus-FACS-Analyse von Verpaarungen mit TCR.Tg4. In Klammern: (Alter in Wochen / Thymozytenzahl in Millionen). Zahlen in den Quadranten: Prozent der Thymozyten im jeweiligem Quadrant. **a), b), c), d):** Jeweils einzelne Experimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Färbungen von CD4 gegen CD8. Als Kontrollen sind einzeltransgene (TCR.Tg4) bzw. transgenegative (wt) aus denselben Würfen gezeigt. Einzeltransgene AMK oder AMY-Thymi unterscheiden sich nicht von wt (nicht gezeigt). **d)** Dreifachfärbung: F23.1-FITC/CD4-PE/CD8-613. In der oberen Reihe ist CD4 gegen CD8 aufgetragen, in der unteren Reihe F23.1-FITC ( $\alpha V\beta 8.2$ ) gegen CD4 aufgetragen. Alle doppeltransgenen Tiere in a)-d) waren entweder H-2<sup>dxu</sup> oder H-2<sup>bxu</sup>.



Fortsetzung Abb. 11:



Linie	Alter	Thymozyten (x 10 <sup>6</sup> )	% Thymozyten CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	% Thymozyten Vβ8.2 <sup>hoch</sup> /CD4 <sup>+</sup>	%T-Zellen (LK) Vβ8.2 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>
B10.PL	6 w	176	83,8	3,8	9,6
TCR.Tg4	5 w	86	57,0	20,7	48,6
	9 w	150	70,9	16,0	30,3
TCR.Tg4 x AMK <sub>12</sub>	7 w	28	70,0	6,3	10,5
	10 w	14	51,3	3,6	10,4
TCR.Tg4 x AMK <sub>33</sub>	6 w	39	44,2	6,7	22,5
	6 w	12	15,8	5,9	3,9
TCR.Tg4 x AMK <sub>35</sub>	6 w	6,7	0,4	1,7	n.b.
	9 w	1,4	0,1	9,0	13,0
	12 w	1,4	0,1	5,3	4,8
	13 w	0,8	1,1	9,0	3,5
TCR.Tg4 x AMK <sub>39</sub>	5 w	28	52,2	1,3	5,5
	9 w	1,2	51,7	6,1	3,8
	11 w	4,0	9,5	2,2	9,4
TCR.Tg4 x AMY <sub>04</sub>	9 w	15	65,1	2,6	5,7
	11 w	12	69,5	2,6	23,7
	13 w	6	56,4	2,1	16,0
TCR.Tg4 x AMY <sub>25</sub>	5 w	57	49,1	2,6	13,6
	5 w	49	61,4	2,7	8,7
TCR.Tg4 x AMY <sub>40</sub>	11 w	10	48,1	1,1	13,1
TCR.Tg4 x AMY <sub>41</sub>	6 w	116	84,8	14,6	25,6
	10 w	62	76,3	5,4	29,3

**Tabelle 2: Zusammenfassung der Daten über thymische Deletion in den unterschiedlichen doppeltransgenen Tieren. LK: Lymphknoten; n.b.: Nicht bestimmt.**

Transgen	Maus-Linie	RT-PCR	Deletion
<b>AMK</b>	AMK <sub>12</sub>	+	+
	AMK <sub>33</sub>	++	+
	AMK <sub>35</sub>	++	+++
	AMK <sub>39</sub>	++	+++
<b>AMY</b>	AMY <sub>04</sub>	++	++
	AMY <sub>25</sub>	+/-	+
	AMY <sub>40</sub>	+/-	++
	AMY <sub>41</sub>	+/-	+/-

Tabelle 3: Entscheidungskriterien zur Selektion der transgenen Founder.

Die Analyse von doppeltransgenen Tieren zeigte deutlich, daß die Transgene im Thymus exprimiert werden und zur negativen Selektion von antigenspezifischen T-Zellen in TCR-transgenen Tieren führen. Die RT-PCR zeigte, daß die Transgene auch in der Peripherie exprimiert werden. Aufgrund der höheren Expression auf RNA-Ebene, gezeigt in der RT-PCR, und der Daten der negativen thymischen Selektion wurden die Linien **AMK<sub>35</sub>**, **AMK<sub>39</sub>** und **AMY<sub>04</sub>** für die weitere Arbeit ausgewählt.

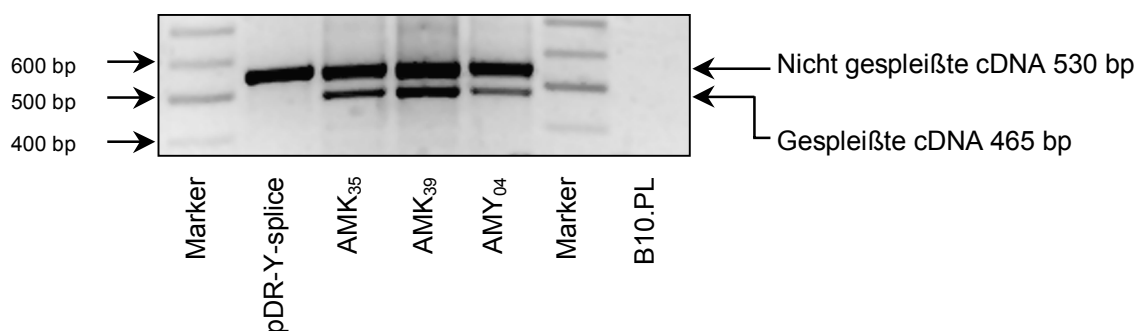
## 5.2 Charakterisierung der selektionierten transgenen Linien

Die selektionierten Linien wurden genauer charakterisiert. Es wurden die Expression, die Spezifität der Expression, und die funktionellen Auswirkungen der Transgenexpression, wie Aktivierung von T-Zellen, Thymische Deletion und Toleranz, untersucht. Da dies durch den hohen Aufwand nicht immer für alle Linien möglich war, wurden einzelne Experimente exemplarisch mit nur einer Mauslinie durchgeführt. Die Invariante Kette bindet über CLIP in die Peptidbindungsgrube des MHC II-Moleküls und führt dieses in endosomale/lysosomale Kompartimente. In diesen Kompartimenten wird CLIP durch andere, besser bindende Peptide ausgetauscht. Dadurch kommt es in transgenen Tieren, die ein kovalentes Peptid-MHC II exprimieren, auf dem Invariante Kette Wildtyp-Hintergrund (li-wt) zum Austausch eines Großteils dieser Peptide. In Tieren mit einem Invariante Kette Knockout-Hintergrund (li-ko) ist jedoch der größte Teil der transgenen MHC II Moleküle mit dem kovalent gebundenen Peptid besetzt (Ignatowicz et al., 1996a). Daher wurden die drei Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> zudem auf li-ko Hintergrund zurückgekreuzt.

### 5.2.1 Expression

#### 5.2.1.1 mRNA-Splicing

Da Introns in Transgenkonstrukten zu einer verstärkten Expression führen, wurde untersucht, ob das SV40-Intron aus der Vorläufer-RNA herausgespleißt wird. Es wurde cDNA mit Hexanukleotiden hergestellt, die sowohl an reife, als auch an völlig unprozessierte mRNA binden. Die PCR wurde mit Primern durchgeführt, die gespleißte und ungespleißte cDNA amplifizieren konnten.



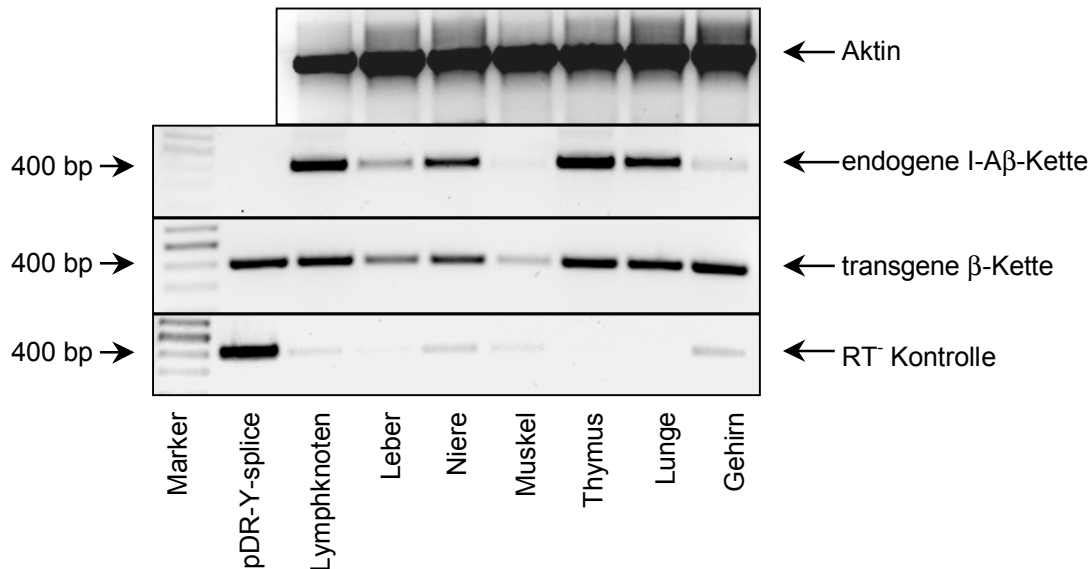
**Abb. 12: Die transgene RNA wird korrekt prozessiert.** RT-PCR von Lymphknoten-RNA. Die cDNA wurde hergestellt mit Hexanukleotiden. Das 65 bp große SV40 ST-Intron wird während der RNA-Prozessierung herausgespleißt. Für die PCR wurden Primer verwendet, die sowohl ungespleißte als auch gespleißte cDNA amplifizieren (5'βgen + 3'αβ-splice). Zur Auflösung der beiden Banden wurde ein 2% Agarosegel verwendet.

Das Gel zeigt, daß zumindest in dem von den Primern abgedeckten Bereich das kleine 65 bp-Intron aus der mRNA der transgenen β-Kette in allen transgenen Mauslinien korrekt ent-

fernt wird. Dies war wichtig zu zeigen, da für das SV40 ST-Intron ein aberrantes Spleißen der 5'-Spleiße-Stelle gezeigt wurde (Huang und Gorman, 1990).

#### 5.2.1.2 Expressionsmuster

Bei den Organen der Linie AMK<sub>35</sub> wurde die Expression der Transgene im Vergleich mit der endogenen I-A $\beta$ -Kette mittels RT-PCR untersucht (Abb. 13). Zellen, die MHC Klasse II (MHC II) exprimieren, werden normalerweise in Milz, Lymphknoten, Blut, Thymus, Knochenmark, Lunge sowie in stark durchbluteten Organen gefunden.



**Abb. 13: RT-PCR verschiedener Organen von AMK<sub>35</sub>.** PCR von cDNA gewonnen aus RNA der angezeigten Organe. Die Organe wurden nicht perfundiert. Die eingesetzten cDNA-Mengen wurde anhand der Aktin-Expression in einem Vorexperiment normiert. Die schwachen Banden in der RT Kontrolle zeigen das Vorhandensein von restlicher genomischer DNA, die von den Primern für die transgene  $\beta$ -Kette nicht von cDNA unterschieden werden können.

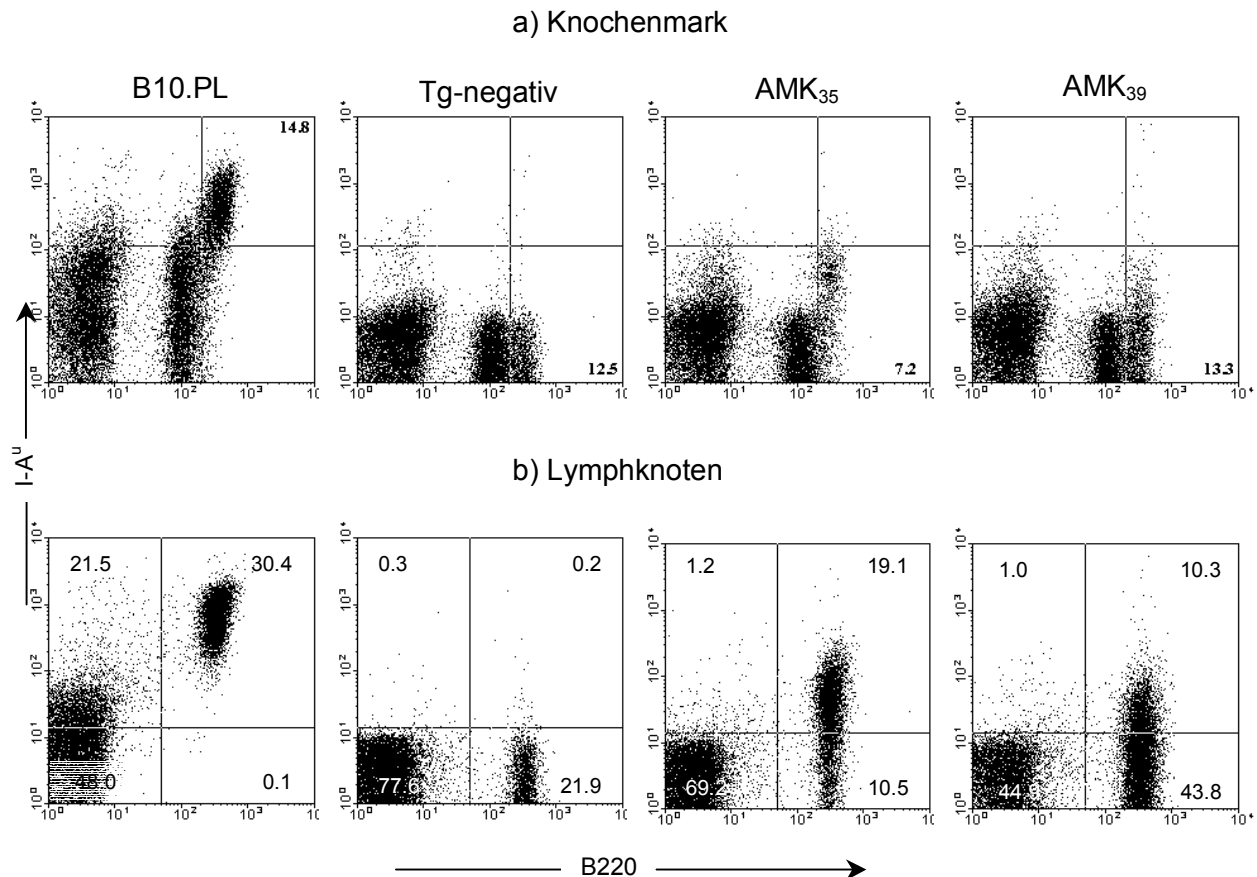
Die Expression der transgenen  $\beta$ -Kette in AMK<sub>35</sub> zeigt bis auf Gehirn dasselbe Muster wie die endogene I-A $\beta$ -Kette. Die RT-Kontrolle zeigt zwar eine schwache Bande beim Gehirn, was auf restliche genomische DNA zurückzuführen ist, dies kann jedoch nicht die starke Bande der RT-PCR von Gehirn erklären.

#### 5.2.1.3 Transgenexpression auf Proteinebene

Die Expression auf Proteinebene wurde mittels FACS-Analyse mit Knochenmarkszellen, Milz-, und Lymphknotenzellen sowie mit in vitro gewonnenen Dendritischen Zellen (BM-DC's) untersucht. Für die Analyse von Knochenmark, sowie Milz- und Lymphknotenzellen wurden Tiere auf Invariante Kette wildtyp (li-wt)-Hintergrund verwendet. Mit den BM-DC's wurden Tiere der Linie AMK<sub>35</sub> sowohl auf li-wt als auch li-ko Hintergrund untersucht.

Die Färbung von Knochenmarkszellen mit einem I-A<sup>u</sup> spezifischen Antikörper (Abb. 14a) zeigt, daß I-A<sup>u</sup> in B10.PL-Tieren hauptsächlich von Prä-B-Zellen und unreifen B-Zellen (beide B220<sup>hoch</sup> (Tarlinton, 1993) ) exprimiert wird. Die B220 niedrig exprimierenden Pro-B-Zellen

exprimieren kein I-A<sup>u</sup>. Die Transgene in AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> sind deutlich niedriger exprimiert, als das endogene I-A<sup>u</sup> in B10.PL. In beiden Linien werden die Transgene spezifisch von Prä-B-Zellen und unreifen B-Zellen exprimiert. Dies bedeutet, daß die Transgene unter Kontrolle des humanen DR $\beta$ -Promotor zumindest in B-Zellen normal und entwicklungsspezifisch, also nicht ektopisch, exprimiert werden. Die Färbung von Lymphknotenzellen (Abb. 14b) zeigt auch die spezifische Expression der Transgene von B-Zellen. Auch hier ist die Expression schwächer als I-A<sup>u</sup> in B10.PL. In beiden Organen ist die Expression in AMK<sub>39</sub> schwächer als in AMK<sub>35</sub>. Dies korreliert mit der stärkeren thymischen Deletion in AMK<sub>35</sub>.

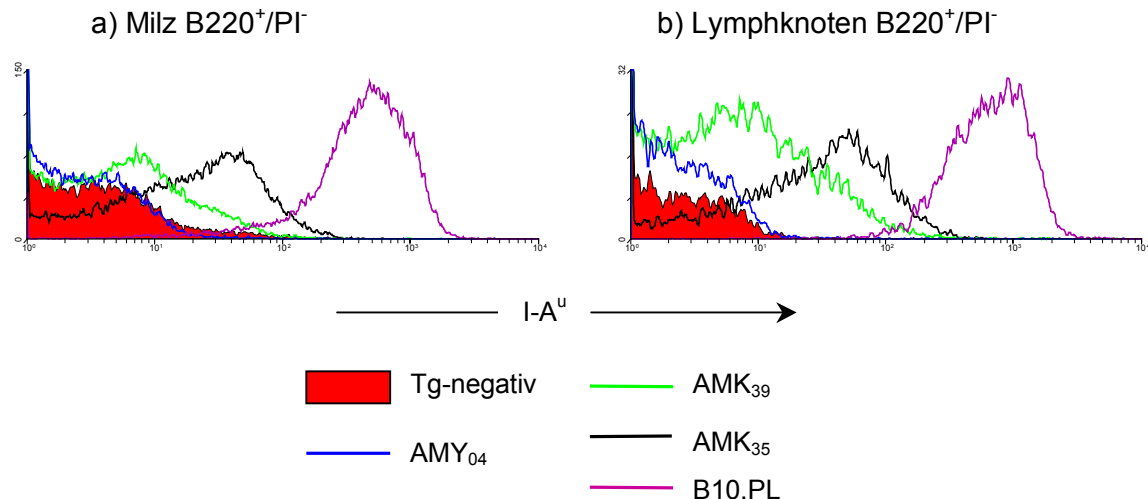


**Abb. 14: MHC Klasse II spezifische Expression von Transgenen im Knochenmark und Lymphknoten.** FACS-Analyse von **a)** Knochenmarkszellen und **b)** Lymphknotenzellen elektronisch gegatet auf lebendige (PI<sup>-</sup>) Zellen. I-A<sup>u</sup> –Färbung mit MKS4-bio/SA-PE; CD45R mit B220-FITC. Zahlen in den Quadranten: Prozent der Zellen im jeweiligem Quadrant. B220<sup>mittel</sup>: Pro-B-Zellen; B220<sup>hoch</sup>: Prä-B-Zellen und reife B-Zellen. Alle Tiere außer B10.PL waren H-2<sup>b</sup>.

In Abb. 15 ist ein Vergleich der Transgenexpression der verschiedenen Linien auf B-Zellen in Milz (a) und Lymphknoten (b) gezeigt. Da in AMY<sub>04</sub> nur ein Peptid mit wenigen AS von I-A<sup>u</sup> $\beta$  exprimiert wird, ist trotz des gleich starken RT-PCR-Signals mit dem I-A<sup>u</sup> spezifischen Antikörper keine Expression auf Proteinebene meßbar. Die Expression des Transgens in AMK<sub>35</sub> entspricht ca. 1/18 der Expression von I-A<sup>u</sup> in B10.PL (MFI 28 vs. 517) und ist ca. 4mal höher als in AMK<sub>39</sub> (MFI 6,9).

Da der verwendete Antikörper auch nichttransgenes I-A<sup>u</sup> erkennt, mußten zur Bestimmung der Transgenexpression Mäuse verwendet werden, die kein endogenes I-A<sup>u</sup> exprimie-

ren. In diesen Tieren gibt es daher keine endogene I-A<sup>u</sup> $\alpha$ -Kette. Viele MHC-Klasse II Moleküle zeigen eine präferentielle Paarung der komplementären Ketten desselben Haplotyps (Braunstein und Germain, 1987; Germain et al., 1985; Le Meur et al., 1989; Martin et al., 1993). Daher ist es möglich, daß in Verpaarungen mit I-A<sup>u</sup> positiven Tieren (wie z.B. in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>) die transgene  $\beta$ -Kette durch die Paarung mit endogener I-A<sup>u</sup> $\alpha$  deutlich stärker an der Zelloberfläche exprimiert wird.

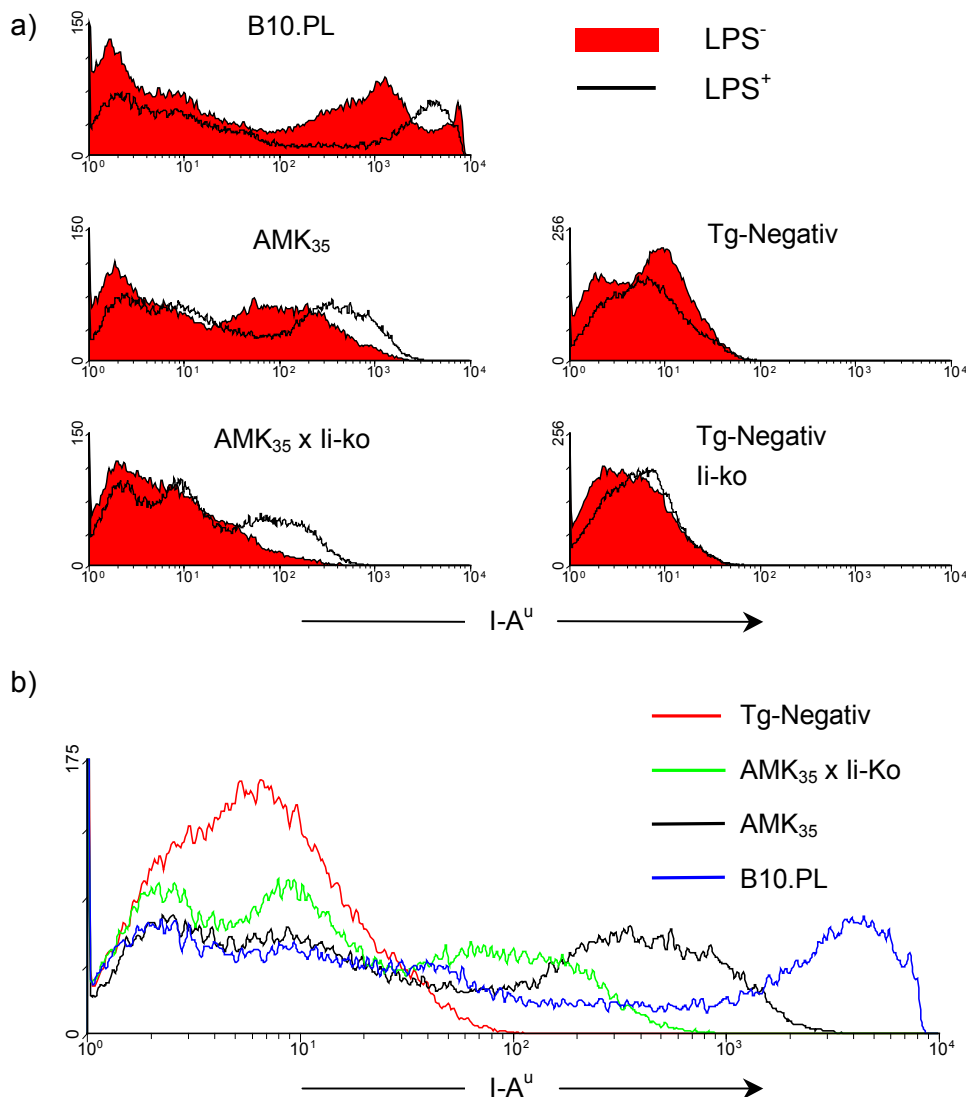


**Abb. 15: Vergleich der Transgenexpression auf B-Zellen.** FACS-Analyse von **a)** Milzzellen und **b)** Lymphknotenzellen. Histogramme zeigen Färbungen gegen I-A<sup>u</sup> (mit MKS4-bio/SA-PE) nach elektronischem Gaten auf lebende (PI<sup>-</sup>) B-Zellen (B220<sup>+</sup>). Alle Tiere außer B10.PL waren H-2<sup>b</sup>. Tg-negativ: transgen-negativ. (MFI für Milz: Tg-negativ: 4,9; AMY<sub>04</sub>: 2,7; AMK<sub>39</sub>: 6,9; AMK<sub>35</sub>: 28,0; B10.PL: 517,1).

Da es für die hier verwendete Peptid-MHC Kombination keinen Antikörper gibt, mit dem spezifisch der Anteil eines mit einem bestimmten Peptid beladenen MHC-Moleküls meßbar ist, ist es nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, welcher Anteil der transgenen MHC-Moleküle mit dem MBP-Peptid beladen ist.

Dendritische Zellen (DC's) sind die APC's mit der stärksten stimulatorischen Kapazität für naive T-Zellen und zeigen nach Aktivierung (wie z.B. mit TNF $\alpha$  oder LPS ) eine sehr hohe MHC-Klasse II Expression (Lutz et al., 1999). Daher wurden aus Knochenmarkszellen durch Differenzierung mit GM-CSF sogenannte BM-DC's (engl.: *Bone Marrow derived Dendritic Cells*) gewonnen. Durch das verwendete Protokoll erhält man unter den Zellen in Suspension drei verschiedene Populationen: 1. eine MHC II negative Population (ca. 30%), dies sind Granulozyten und myeloide Vorläuferzellen. 2. eine Population mit niedriger MHC II-Expression (ca. 50%), dies sind ca. 6% B-Zellen und der Rest unreife BM-DC's. 3. Zellen mit sehr hoher MHC II und I Expression (ca. 20%). Dies sind reife BM-DC's, die auch die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 exprimieren. Nach der Differenzierung können die unreifen BM-DC's mit LPS aktiviert, das heißt zur Reifung angeregt werden. Dadurch steigt der Anteil der reifen DC's auf ca. 50 % (Lutz et al., 1999). In Abb. 16a ist die I-A<sup>u</sup>-Expression vor und nach LPS-Stimulation auf Dendritischen Zellen der Linie AMK<sub>35</sub> auf li-wt, sowie auf li-ko Hintergrund und den entsprechenden Kontrollen gezeigt.





**Abb. 16: Transgen-Expression von AMK<sub>35</sub> auf Dendritischen Zellen vor und nach LPS-Stimulation.** Dendritische Zellen wurden aus Knochenmarkszellen der bezeichneten Mäuse durch Differenzierung in GM-CSF-haltigem Medium gewonnen. **a)** Die Histogramme zeigen FACS-Analysen von PI<sup>-</sup> Dendritischen Zellen nach 24h LPS-Aktivierung (1µg/ml) im Vergleich zu nicht aktivierten Zellen. **b)** Vergleich der I-A<sup>u</sup> bzw. Transgen-Expression auf LPS-stimulierten Dendritischen Zellen der verschiedenen Mäuse. Die I-A<sup>u</sup>-Färbung wurde mit 10-2-16-bio/SA-PE durchgeführt. Die Dendritischen Zellen zeigten nach LPS-Stimulation verschiedene Anzeichen der Aktivierung wie: deutliche Größenzunahme, Hochexpression von endogener MHC-Klasse II und CD86 (nicht gezeigt).

In B10.PL, sowie in AMK<sub>35</sub> ist deutlich die durch die LPS induzierte Reifung der DC's als Hochregulation von I-A<sup>u</sup> zu erkennen. Der hohe Peak bei ca. 1000 in B10.PL verschiebt sich auf ca. 4000. Dies spiegelt die Differenzierung von unreifen zu reifen, aktivierten DC's wider. In Abb. 16b ist ein Vergleich der LPS-aktivierten BM-DC's der verschiedenen Linien gezeigt. Die Expression von I-A<sup>u</sup> in AMK<sub>35</sub> x li-wt entspricht ca. 1/10 der Expression in B10.PL und ist ca. 4-5 mal höher als in AMK<sub>35</sub> x li-ko. Es ist darauf hinzuweisen, daß die Färbungen in Abb.

15 und der Abb. 16 in zwei unterschiedlichen Experimenten und mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt wurden, und daher nicht direkt vergleichbar sind.

*Die Experimente zur Expression zeigen, daß die Transgene korrekt prozessiert, und sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene spezifisch also nicht ektopisch exprimiert werden. Zudem werden sie im Knochenmark im richtigen entwicklungsspezifischem Kontext exprimiert und nach LPS-Induktion auf Dendritischen Zellen wie endogenes MHC Klasse II hochreguliert.*

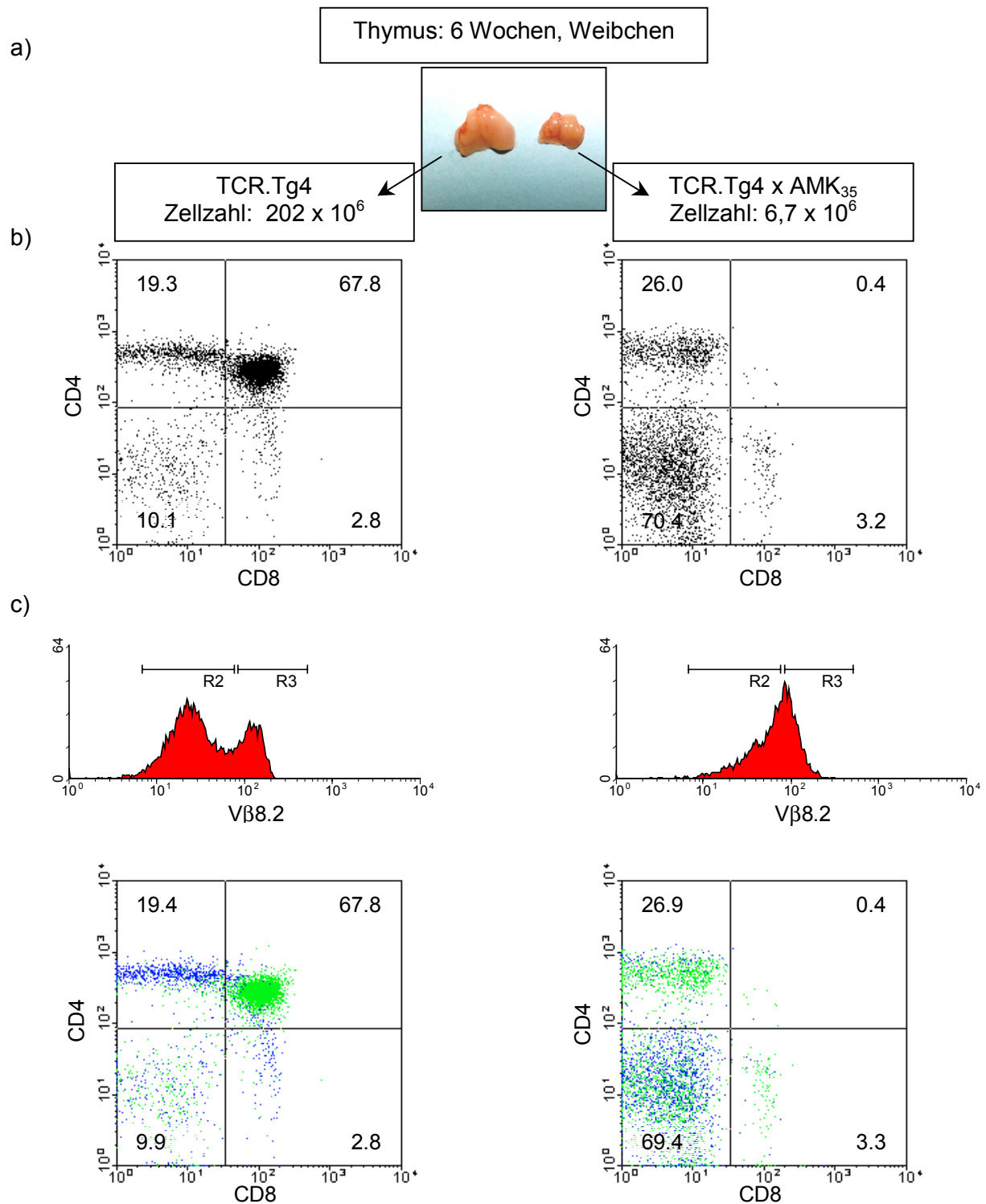
## **5.2.2 Auswirkungen der Transgenexpression auf das T-Zellrepertoire**

### 5.2.2.1 Thymische Deletion

Die bei der Selektion der transgenen Linien beschriebene thymische Deletion in doppeltransgenen Tieren wurde für die Linie AMK<sub>35</sub> eingehender untersucht. Abb. 17a zeigt einen Größenvergleich zwischen einem Thymus einer einzeltransgenen TCR.Tg4-Maus und einem Thymus einer doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>, sowie die Thymozytenzahl des jeweiligen Thymus. Auffallend ist bei der Verringerung der Größe auf ca. 1/4 die viel stärkere Zellzahlverringern auf 1/30. Da bei der Zellzahlbestimmung die Lebendzellzahl einer Einzelzellsuspension bestimmt wurde, wurden die Thymusstroma- und Epithelzellen, sowie die apoptotischen Zellen nicht in die Zellzahl mit einbezogen, da diese bei der Präparation verloren gehen bzw. Trypan-Blau positiv (tot) sind. Zudem sind die den Thymus aufbauenden Zellen deutlich größer als die in der Zellzahl bestimmten Thymozyten und fallen daher bei der Thymusgesamtgröße stärker ins Gewicht.

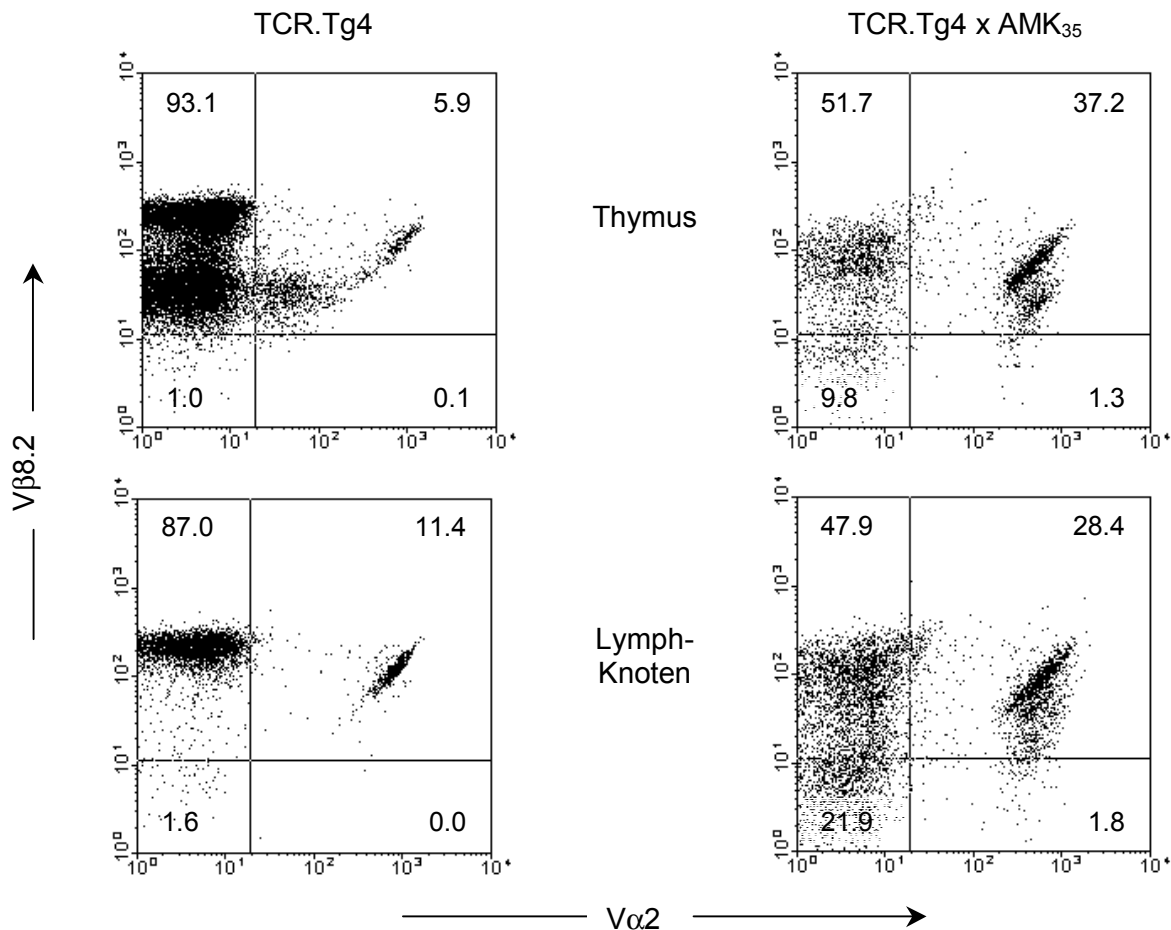
Die FACS-Analyse der restlichen Thymozyten (Abb. 17b) zeigt, daß in doppeltransgenen Tieren praktisch keine doppelpositiven CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen (DP) mehr vorhanden sind. Der Großteil der Zellen ist Doppelnegativ (DN) oder CD4-einzelnpositiv (SP). Dies läßt vermuten, daß die Thymozyten bereits beim Übergang zum doppelpositiven Stadium deletiert werden. Die Färbung der transgenen TCR-β-Kette Vβ8.2 (Abb. 17c) zeigt, daß die Thymozyten in einzeltransgenen TCR.Tg4-Mäusen bezüglich der Vβ8.2-Kette aus zwei Populationen bestehen: Eine mit niedriger Vβ8.2 Expression (R2 grün markiert), dies sind v.a. DP's. Und eine mit hoher Expression (R3 blau markiert), dies sind v.a. CD4- und ein paar CD8-SP Zellen.

In doppeltransgenen Tieren ist dieses Bild stark verändert. Es gibt nur noch eine Population mit niedriger bis mittelhoher Vβ8.2 Expression, und wenige Zellen mit hoher Expression. Die CD4-SP Zellen in doppeltransgenen Tieren haben fast alle eine niedrige Vβ8.2 Expression, während die wenigen Zellen mit hoher Expression v.a. in der DN Population sind. Auch die SP CD8-Zellen haben fast alle eine niedrige Expression der transgenen TCR β-Kette. Aus den Färbungen wird deutlich, daß die Thymozyten in doppeltransgenen Tieren entweder CD4 (bzw. CD8) oder den transgenen TCR hoch exprimieren. Die Zellen, die beides exprimieren, werden wahrscheinlich deletiert.



**Abb. 17: Thymische Deletion in Doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK35 Tieren.** a) Thymi von Geschwistertieren (ca.1:1). b) FACS-Analyse von in a) bezeichneten Thymi gefärbt mit F23.1-FITC ( $\alpha$ V $\beta$ 8.2), CD8-PE, CD4-613. c) Histogramme der V $\beta$ 8.2-Färbung in b). R2 (= Region 2) markiert Zellen mit mittlerer V $\beta$ 8.2 Expression und R3 mit hoher Expression. Die Dotblots zeigen Zellen aus beiden Regionen R2 oder R3. Grüne Punkte sind aus R2 (mittlere V $\beta$ 8.2 Expression) und blaue Punkte aus R3 (hohe V $\beta$ 8.2 Expression). Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadrant unabhängig ob aus R2 oder R3.

Trotz der massiven Deletion im Thymus gelangen in doppeltransgenen Tieren noch CD4-Zellen, die positiv für die transgenene V $\beta$ 8.2-Kette sind, in die Peripherie. Diese sind in der Anzahl reduziert und exprimieren deutlich weniger transgene TCR  $\beta$ -Kette (siehe unten). Die allele Exklusion der TCR V $\alpha$ -Kette ist nicht vollständig (Heath et al., 1995; Padovan et al., 1993). Zudem induziert die Expression von negativ selektionierenden Liganden im Thymus von TCR-transgenen Mäusen die Rekombination und Expression der endogenen V $\alpha$ -Ketten (McGargill et al., 2000).



**Abb. 18: Expression der endogenen V $\alpha$ 2-TCR Kette auf CD4<sup>+</sup>Zellen in doppeltransgenen Tieren.** FACS-Analyse von Thymus (oben) und Lymphknoten (unten) der bezeichneten Mäuse. Gezeigt sind Dotplots gated auf CD4<sup>+</sup>Zellen. Die Zellen wurden gefärbt mit F23.1-FITC ( $\alpha$ V $\beta$ 8.2), V $\alpha$ 2-bio/SA-PE, CD4-613. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadrant. Beide Mäuse waren 12 Wochen alte Weibchen und waren H-2<sup>dxj</sup>.

Daher wurden Thymozyten und Lymphknotenzellen auf die endogene V $\alpha$ 2-Kette untersucht. Die FACS-Färbung (Abb. 18) zeigt, daß 6% der CD4<sup>+</sup>Thymozyten (also CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> DP's und CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> SP) und 11,4% der peripheren CD4 T-Zellen aus TCR.Tg4 Tieren die endogene TCR V $\alpha$ 2-Kette exprimieren. Im Thymus gibt es zwei Populationen, eine, welche die transgene V $\beta$ 8.2 Kette und die endogene V $\alpha$ 2-Kette niedrig (DP's), und eine, die beide hoch exprimiert (SP's). In der Peripherie existiert nur eine Population, die beide Ketten hoch exprimiert.

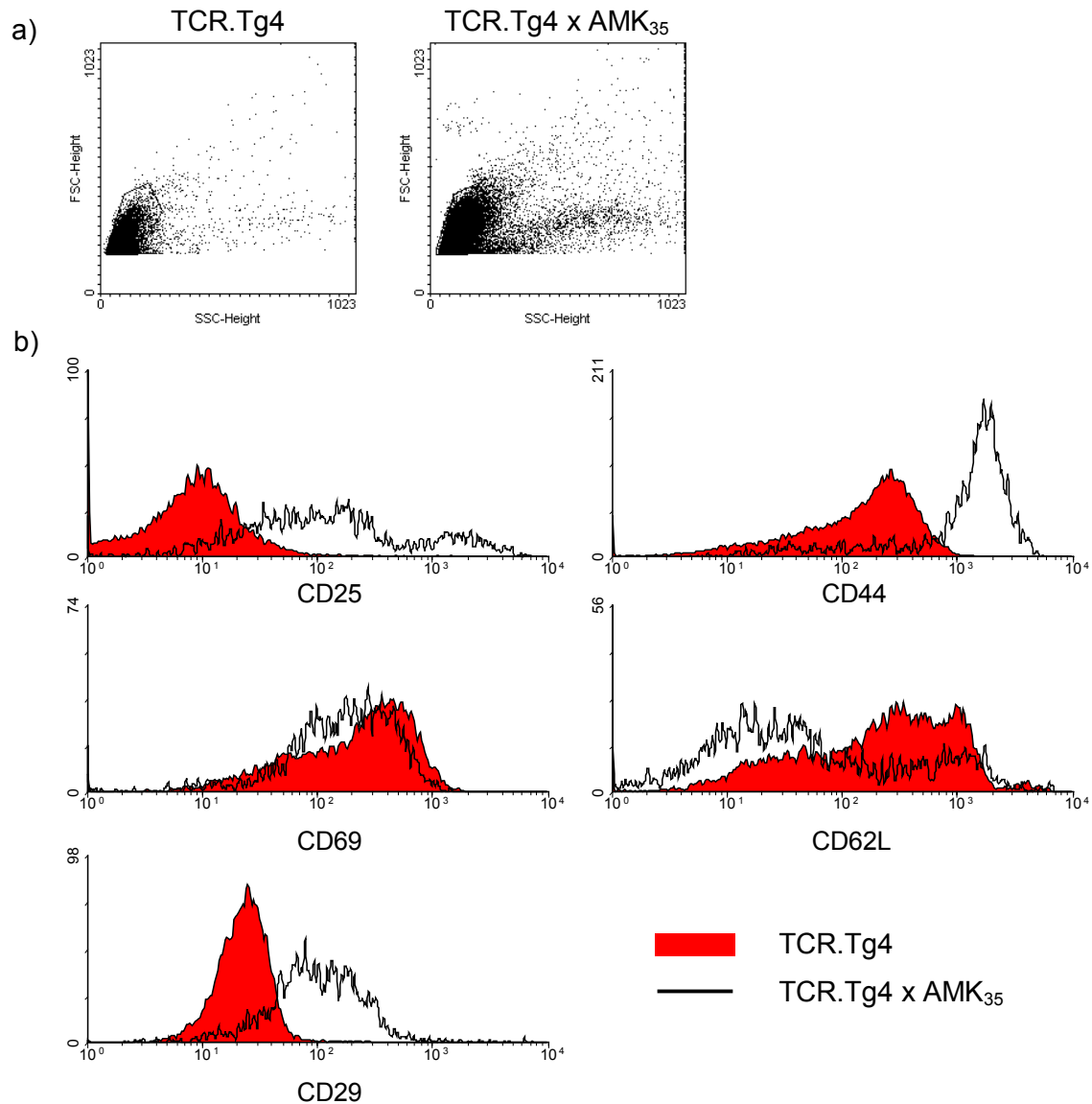
In doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren exprimieren fast 40% der CD4<sup>+</sup>-Thymozyten und fast 30% der peripheren CD4 T-Zellen die endogene V $\alpha$ 2-Kette. Auch hier gibt es zwei Thymozytenpopulationen bezüglich der V $\beta$ 8.2 Expression. Beide haben jedoch eine hohe Expression der endogenen V $\alpha$ 2-Kette. Dies spricht dafür, daß bereits Zellen mit niedriger Expression des transgenen TCR die Expression endogener V $\alpha$ -Ketten zum Überleben benötigen. Im Gegensatz zu den einzeltransgenen CD4<sup>+</sup>T-Zellen bleibt die zweite Population mit niedriger V $\beta$ 8.2-Expression in der Peripherie jedoch erhalten. Interessanterweise sind der Großteil der peripheren CD4-Zellen, die die endogene V $\alpha$ 2-Kette exprimieren, eher Zellen mit einer höheren Expression der transgenen V $\beta$ 8.2-Kette. Dies deutet darauf hin, daß diese Zellen durch die Paarung der transgenen V $\beta$ -Kette mit der endogenen  $\alpha$ -Kette nicht mehr durch das Transgen aktiviert werden, und daher auch den TCR nicht runterregulieren. Dies würde heißen, daß die transgene V $\alpha$ 4-Kette in diesen Zellen wahrscheinlich nicht an die Zelloberfläche kommt.

Thymozyten durchlaufen während der Reifung unterschiedliche Entwicklungsstadien, die durch Differenzierungsmarker, Rekombinationszustand der TCR-Ketten, und Expression verschiedener Aktivierungsmarker unterschieden werden können. Zudem kann starke Antigenstimulation auch die Expression von Aktivierungsmarkern auf Thymozyten hervorrufen. Es wurden daher Thymozyten aus doppeltransgenen Tieren auf die Expression verschiedener Aktivierungsmarker untersucht (Abb. 19). In Tabelle 4 sind die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Thymozytenreifung mit der Expression phänotypischer Marker aufgeführt. Die ersten vier Stadien gehören zu der Population der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> Doppelnegativen (DN). In dem letzten Stadium der DN wird bereits die TCR  $\beta$ -Kette zusammen mit der Surrogat-prät  $\alpha$ -Kette exprimiert. Während dem doppelpositiven (DP) Stadium wird die TCR  $\alpha$ -Kette rekombiniert und exprimiert. Beide Ketten werden jedoch ca. 10-fach niedriger exprimiert als in reifen T-Zellen. In diesem Stadium kommt es zur positiven Selektion. Die Zellen, die diese Selektion überleben, stoppen die Expression von CD4 oder CD8 und exprimieren die TCR-Ketten und CD3 hoch. Diese Einzelpositiven Zellen (SP) werden an der Grenze zwischen Kortex und Medulla und in der Medulla negativ selektioniert. In der Medulla beenden die SP-Thymozyten die Reifung und verlassen als sogenannte "Recent Thymic Emigrants" (RTE) den Thymus. Die Expression von CD25 und CD44 ist auf die ersten Phasen im DN-Stadium begrenzt. CD69 wird während der positiven und der negativen Selektion im späten DP und frühen SP-Stadium exprimiert. Der Lymphknoten-Homing Rezeptor CD62L wird nur von ganz reifen Thymozyten kurz vor der Emigration hoch exprimiert. Die Integrin  $\beta$ 1-Kette CD29 ist in allen Entwicklungsstadien exprimiert, liegt jedoch in unterschiedlichen Aktivierungsformen und in Paarungen mit unterschiedlichen Integrin  $\alpha$ -Ketten vor. Bis in die frühen DP-Stadien sind die Zellen groß.

Subpopulation	Prozeß	TCR $\alpha$	TCR $\beta$	CD3	CD44	CD25	CD69	CD62L	Größe	Ort
<b>DN</b> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	Prol.	-	-	-	+	-	-	lo	groß	Kortex
	$\beta$ -rek.	-	-	-	+	+				
	$\beta$ -rek/Prol	-	-	-	lo	+				
	Prol.	pT	lo	lo	-	-				
<b>DP</b> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Prol.	pT	lo	lo	-	-	-	lo	groß	Kortex
	$\alpha$ -rek.	pT	lo	lo			-		klein	
	Pos. Sel.	lo	lo	lo			-			
	Pos. Sel.	lo	lo	lo			+			
<b>SP</b> CD4 <sup>+</sup> oder CD8 <sup>+</sup>	Neg. Sel.	hi	hi	hi	-	-	+	lo	klein	Kortex/ Medulla
	Reif	hi	hi	hi			-	hi		Medulla

**Tabelle 4: Entwicklungsstadien und Expression von Aktivierungsmarkern von Thymozyten.** Vereinfachte Darstellung der unterschiedlichen Stadien der Thymozytenreifung. Die Entwicklung geht von den doppelnegativen (DN) über die doppelpositiven (DP) zu einzelpositiven (SP) Thymozyten. *Größe* gibt an ob die Zellen als aktive proliferierende Blasten, oder als kleine ruhende Zellen vorliegen. *Prozeß* bezeichnet den diesem Entwicklungsschritt kennzeichnenden Vorgang. *Ort* bezeichnet die Region im Thymus, in welcher der Entwicklungsschritt abläuft. Abkürzungen: *lo*: niedrige Expression, *hi*: hohe Expression; *pT*: pre-T-cell  $\alpha$  (surrogate TCR  $\alpha$ -Kette); *Prol.*: Proliferation;  $\beta$ - oder  $\alpha$ -rek: Rekombination der TCR  $\beta$ - bzw.  $\alpha$ -Kette; *Pos./Neg. Sel.*: Positive und Negative Selektion. Quellen: (Anderson et al., 1999; Campbell et al., 1999; Gabor et al., 1997; Janeway und Travers, 1997; Wadsworth et al., 1995; Wilson et al., 1988; Yamashita et al., 1993)

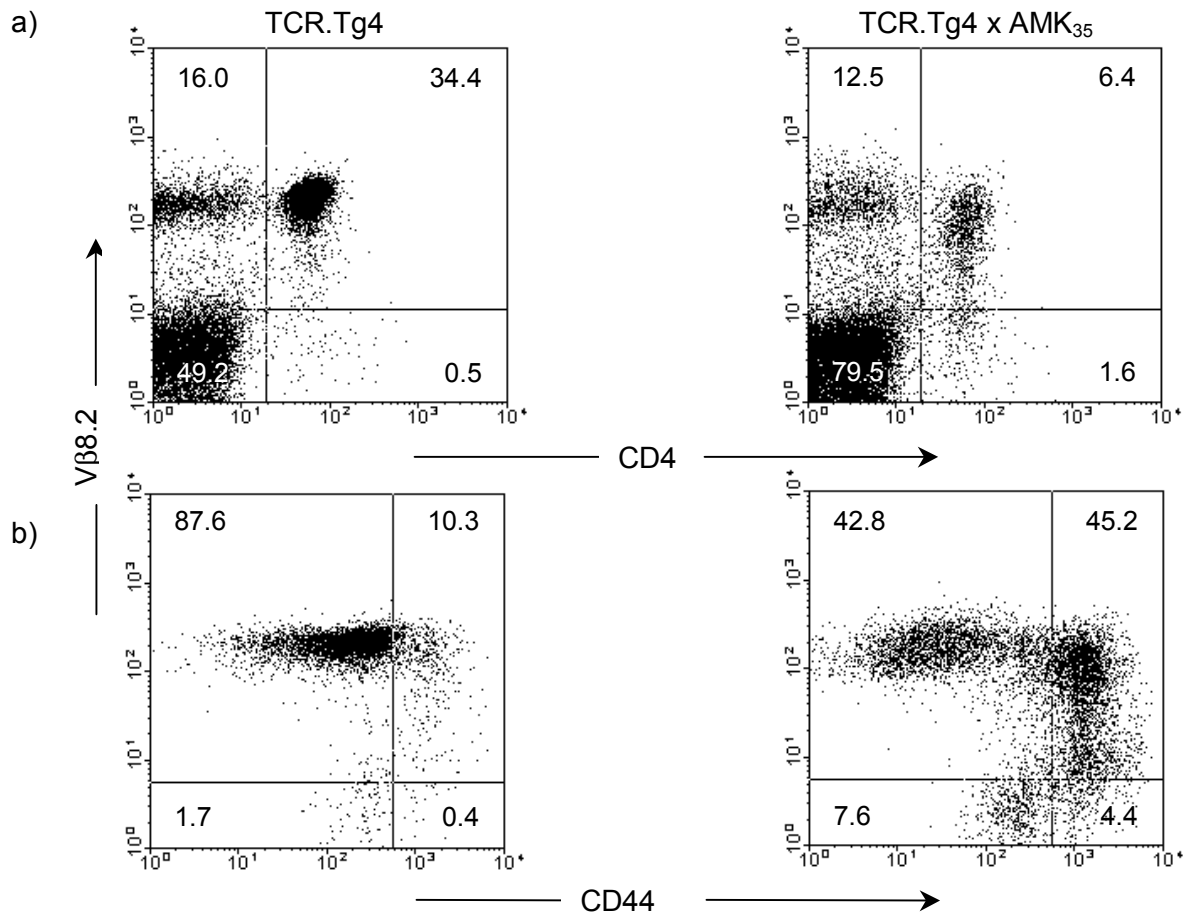
Abb. 19a zeigt, daß die Thymozyten aus doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren größer (höherer FSC) sind, und daß als Folge der negativen Selektion mehr Zellen apoptotisch sind. Die FACS-Analyse in Abb. 19b zeigt die Expression von Oberflächenmarkern auf CD4-positiven Zellen. Das heißt, in TCR.Tg4 sind damit die DP (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) und die SP (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>) dargestellt. Da es in TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren kaum DP-Zellen gibt (siehe Abb. 17), sind hier hauptsächlich SP dargestellt. Sowohl das  $\beta$ 1-Integrin CD29, als auch die Aktivierungsmarker CD25 und CD44 sind deutlich höher exprimiert in doppeltransgenen, CD4-positiven Thymozyten. CD69 ist in seiner Verteilung eher leicht schwächer exprimiert. Der Lymphknoten Homing Rezeptor CD62L wird in doppeltransgenen Tieren nur von wenigen CD4-positiven Thymozyten exprimiert.



**Abb. 19: Aktivierungsmarker auf Thymozyten in Doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren.** FACS-Analysen von Thymozyten. **a)** Dotblots zeigen Forward Side Scatter (FSC) aufgetragen gegen Sideward Side Scatter (SSC). Beide Dotblots zeigen 25000 Zellen. Große aktivierte Zellen haben einen großen FSC und mittleren SSC. Apoptotische und tote Zellen haben einen sehr hohen SSC und mittleren FSC. **b)** Färbung gegen verschiedene Aktivierungsmarker nach elektronischem Gaten auf CD4<sup>+</sup>/Vβ8.2<sup>+</sup> Zellen. Färbungen: F23.1-FITC (αVβ8.2), CD4-613 und gegen die jeweils aufgetragenen Aktivierungsmarker mit biotinylierten Antikörpern und SA-PE. Mäuse siehe Abb. 18.

### 5.2.2.2 Peripheres Restrepertoire in doppeltransgenen Tieren

Um die Auswirkung der Transgenexpression auf periphere CD4-Zellen zu untersuchen, wurden FACS-Analysen, Proliferationsexperimente und EAE-Experimente in einzel- und doppeltransgenen Tieren durchgeführt.

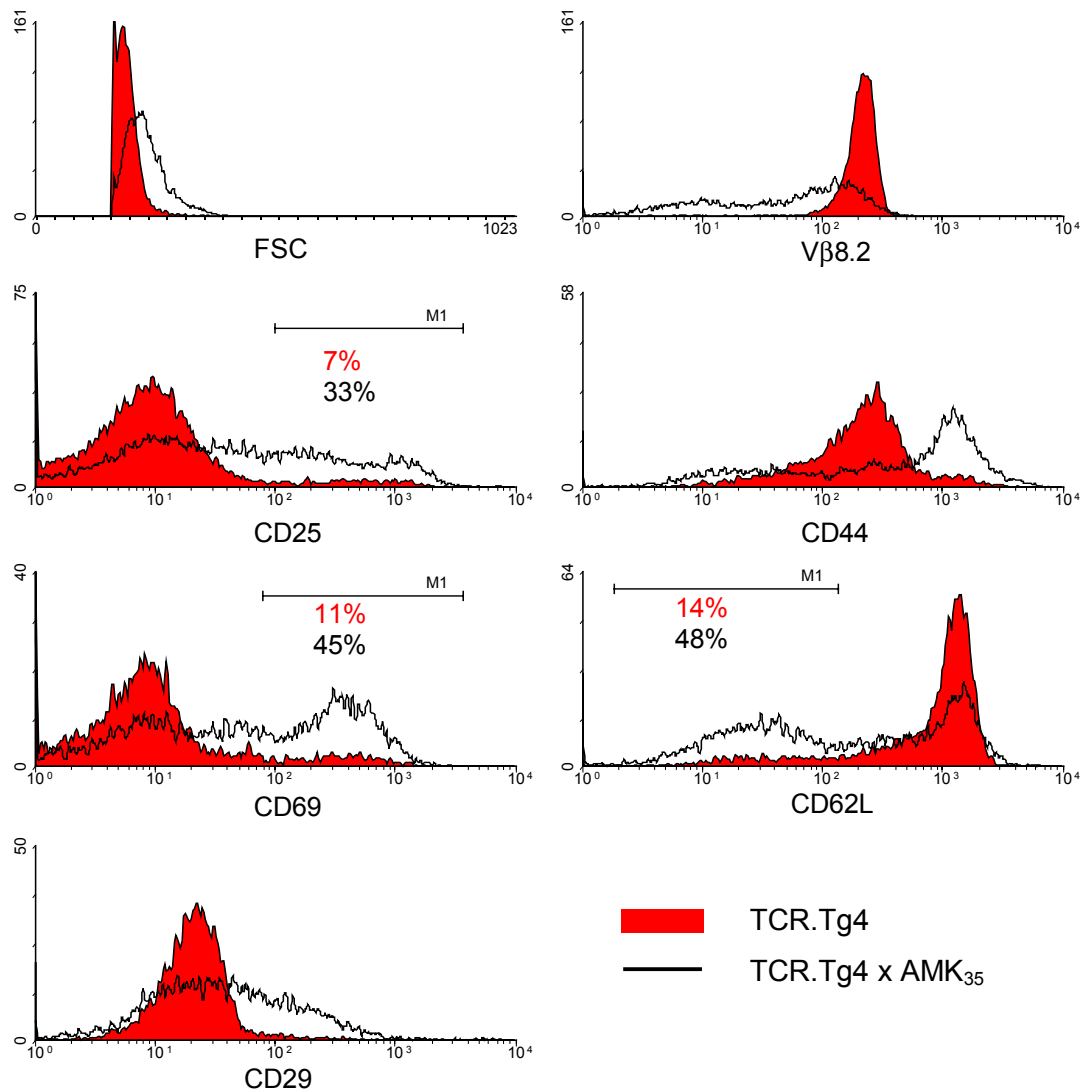


**Abb. 20: Reduktion und Aktivierung von peripheren CD4-Zellen in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren.** FACS-Analysen von Lymphknotenzellen. **a)** Vβ8.2 gegen CD4 aufgetragen. **b)** Färbung gegen CD44 und Vβ8.2 nach elektronischem Gaten auf CD4-Zellen. Färbungen: F23.1-FITC (αVβ8.2), CD4-613, CD44-bio/SA-PE. Mäuse siehe Abb. 17.

Abb. 20a verdeutlicht die starke Reduktion von peripheren CD4-Zellen in Lymphknoten von ca. 35 % in TCR.Tg4 auf ca. 8% in TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>. In doppeltransgenen Tieren ist zudem die transgene Vβ8.2 Kette in vielen Zellen niedrig exprimiert. In Abb. 20b sind CD4-positive Zellen gezeigt, die auf die Vβ8.2 TCR-Kette und CD44 gefärbt wurden. In Doppeltransgenen ist ein deutlich größerer Anteil der Zellen CD44<sup>hoch</sup> (45% vs. 10%). Speziell die Zellen mit niedriger Vβ8.2 Expression sind fast alle CD44<sup>hoch</sup>.

In Abb. 21 sind dieselben Aktivierungsmarker auf peripheren CD4 T-Zellen, wie bei den Thymozyten in Abb. 19 gezeigt.



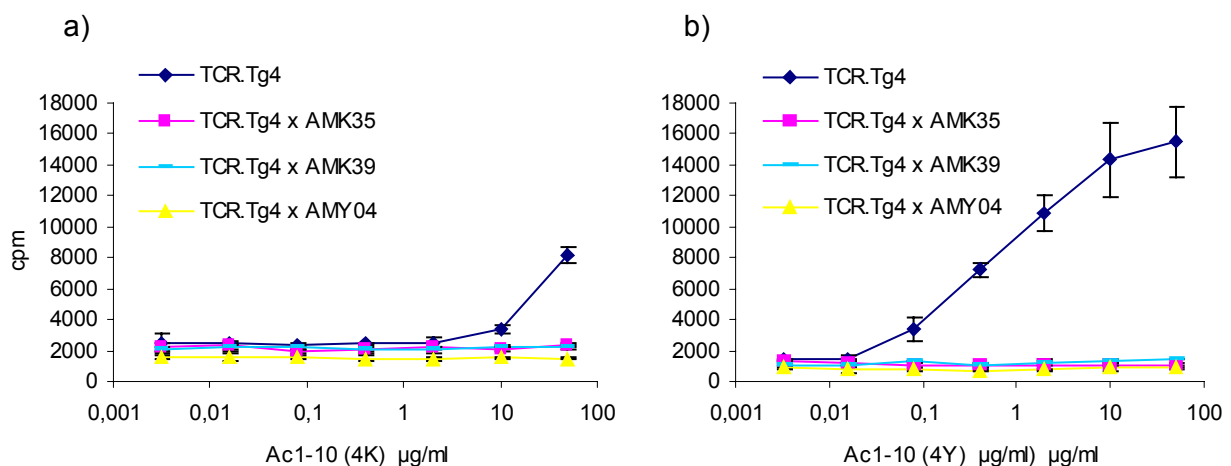


**Abb. 21: Aktivierungsmarker auf peripheren CD4-Zellen in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren.** FACS-Analysen von Lymphknotenzellen nach elektronischem Gaten auf CD4-Zellen. Färbungen: F23.1-FITC ( $\alpha$ Vβ8.2), CD4-613 und gegen die jeweils aufgetragenen Aktivierungsmarker mit biotinylierten Antikörpern und SA-PE. Die Prozentangaben unter den Markern bezeichnen den Anteil der Zellen im jeweiligen Marker des Histogramms. Rot: TCR.Tg4; Schwarz: TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>. Mäuse siehe Abb. 18.

Der FSC zeigt, daß die CD4-Zellen auch in der Peripherie in doppeltransgenen Mäusen größer sind. Das Histogramm mit der Färbung gegen Vβ8.2 verdeutlicht noch einmal die niedrige Expression der transgenen  $\beta$ -Kette in vielen CD4 Zellen von doppeltransgenen Tieren. Aber auch die Population mit hoher Expression in den doppeltransgenen Tieren ist niedriger als die in TCR.Tg4 (ca. 150 vs. 200). Alle gefärbten Aktivierungsmarker CD25, CD44, CD69 und auch CD29 werden in doppeltransgenen Mäusen von einem wesentlich höheren Anteil der CD4-Zellen exprimiert. Ebenso gibt es, typisch für aktivierte T-Zellen, einen deutlich höheren Anteil von CD62L<sup>tief</sup>-Zellen in TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>.

Um zu untersuchen, ob die peripheren CD4-Zellen aus doppeltransgenen Tieren noch mit Antigen stimuliert werden können, wurden Proliferationsexperimente mit Milzzellen dieser Tiere durchgeführt (Abb. 22). Da diese doppeltransgenen Tiere auch endogenes I-A<sup>u</sup> exprimieren, kann exogenes MBP-Peptid den CD4 T-Zellen präsentiert werden. Für diesen Versuch wurden Milzzellen aus doppeltransgenen Tieren aller drei transgenen Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> verwendet.

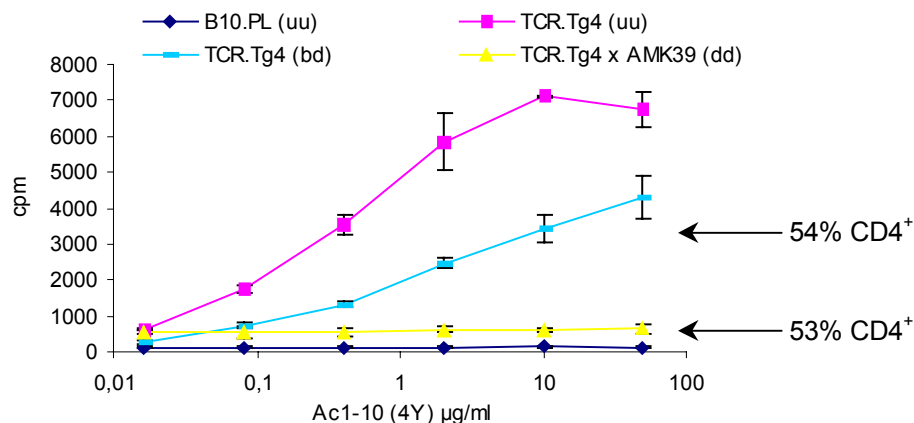
Die Zugabe des niedrigaffinen Ac1-10 (K) Peptides erzeugt nur bei der hohen Konzentration von 50 µg/ml eine deutliche Proliferation in Milzzellen von TCR.Tg4. Das hochaffine Ac1-10 (Y)-Peptid erzeugt schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen ab 0,08 µg/ml eine deutliche Proliferation bei TCR.Tg4 Milzzellen. Die Milzzellen der doppeltransgenen Tiere aller drei Linien reagieren bei allen getesteten Konzentrationen auf keines der beiden Peptide. Für AMY<sub>04</sub> wurde jedoch in einigen Experimenten eine geringe Proliferation bei hohen Peptidkonzentrationen gefunden (nicht gezeigt). Demnach waren trotz der Leserastermutation periphere T-Zellen von doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub> tolerant gegen Peptidstimulation. Dies zeigt, daß die Präsentation des hochaffinen, transgenen Peptides durch endogenes I-A<sup>u</sup> entweder im Thymus oder in der Peripherie zur Toleranz der T-Zellen führte.



**Abb. 22: In vitro-Reaktivität von Milzzellen aus doppeltransgenen Tieren.** Proliferationsversuch mit Milzzellen von TCR.Tg4 bzw. doppeltransgener Tiere. Zu je  $3 \times 10^5$  Zellen wurden die bezeichneten Peptide zutitriert, d.h. die Peptide wurden von den endogenen APC's präsentiert. **a)** MBP 1-10 (4K). **b)** MBP 1-10 (4Y). Die Proliferation wurde über den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt (siehe Methoden). Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen: TCR.Tg4: 14%; TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>: 3%; TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub>: 4%; TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub>: 10%; Die Tiere waren H-2<sup>dxu</sup> bzw. H-2<sup>bxu</sup> (TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub>).

Im Gegensatz zu TCR.Tg4 mit ca. 30-40% CD4-Zellen in Lymphknoten gibt es in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> ca. 7%, in TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> ca. 6% und in TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub> ca. 15% CD4 T-Zellen in den Lymphknoten. Da die doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub> Milzzellen auch nicht auf Peptidzugabe mit Proliferation reagieren, ist es unwahrscheinlich, daß die Zellen der doppeltransgenen Tiere nur durch die geringere Frequenz an CD4 T-Zellen keine Proliferation zeigen. Um jedoch sicher zu gehen, daß dieser Effekt nicht durch die CD4-Zell Frequenz oder durch veränderte APC's hervorgerufen wurde, wurde ein Proliferationsversuch mit TCR.Tg4 und doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> auf I-A<sup>u</sup> negativen Hintergrund angesetzt (Abb. 23). Dazu wurden B-Zell-depletierte Milzzellen mit bestrahlten B10.PL Milzzellen und Ac1-10 (Y) inkubiert. Wie in der Legende gezeigt, waren in diesem

Versuch der Anteil an CD4-Zellen bei einzeltransgenen TCR.Tg4 (bd) und bei doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> (dd) in etwa gleich. Dies war möglich durch die schwächere Deletion in TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> auf H-2<sup>u</sup> negativen Hintergrund (nicht gezeigt). In nicht depletierten Lymphknotenzellen lag der Anteil der CD4-Zellen bei 24% im Vergleich zu 33% in TCR.Tg4 (bd). Trotz der gleichen Anzahl von CD4 T-Zellen in diesem Experiment proliferierten die Zellen des doppeltransgenen Tieres nicht bei Peptidstimulation, während die Zellen von TCR.Tg4 (bd) eine deutliche Stimulation zeigten.



**Abb. 23: In vitro-Reaktivität von angereicherten CD4-Milzzellen aus doppeltransgenen Tieren.** Für diesen Versuch wurden je  $2 \times 10^5$  bestrahlte B10.PL-Milzzellen als APC's mit je  $2 \times 10^5$  B-zell-depletierten "Responder"-Milzzellen (siehe Legende) inkubiert. Anteil der CD4<sup>+</sup>Zellen an den Responderzellen: B10.PL: 60%; TCR.Tg4 (uu): 80%; TCR.Tg4 (bd): 54%; TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> (dd): 53%. Zu den Zellen wurden das bezeichnete Peptid zutitriert. Die Proliferation wurde über den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt (siehe Methoden). Der Haplotyp der Tiere ist in Klammern in der Legende angegeben.

Das Experiment zeigt, daß die T-Zell Population in doppeltransgenen Tieren in vitro tolerant gegen Antigenstimulation ist. Dies ist unabhängig von den APC's dieser Tiere, da auch APC's von nichttransgenen B10.PL Tieren diese Zellen nicht stimulieren können.

### 5.2.2.3 Toleranz der transgenen Tiere gegenüber EAE-Induktion

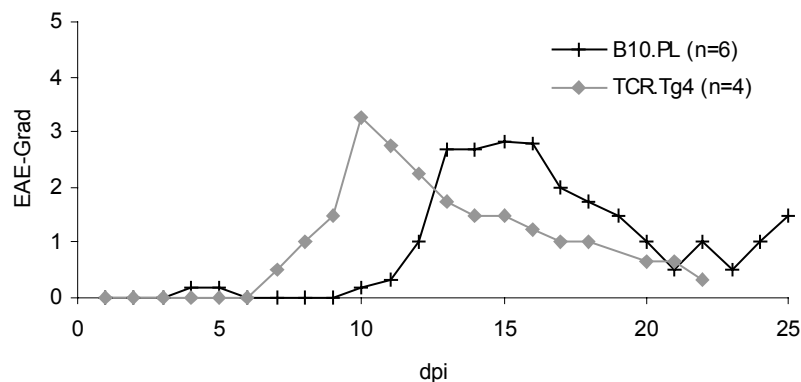
Um zu testen, ob die in vitro gefundene Toleranz auch in vivo zur Toleranz führt, wurde in einzel- sowie doppeltransgenen Tieren EAE aktiv, das heißt mit Peptid in CFA und Pertussis-toxin induziert. Die einzeltransgenen Tiere für diese Versuche waren F1-Tiere aus Verpaarungen mit B10.PL und somit heterozygot für I-A<sup>u</sup> und hemizygot für die Transgene. Die doppeltransgenen Mäuse waren durch die Verpaarung mit TCR.Tg4 auf H-2<sup>u</sup> Hintergrund auch heterozygot für I-A<sup>u</sup>. Als Kontrollen wurden jeweils die einzel-, bzw. nichttransgenen Geschwistertiere genommen. Die EAE-Einteilung erfolgte nach Tabelle 5.

Das Experiment in Abb. 24 zeigt die EAE-Induktion in TCR.Tg4 und B10.PL Tieren (beide H-2<sup>u</sup>). Die TCR.Tg4-Tiere waren von D. Wraith auf B10.PL-Hintergrund zurückgekreuzt worden. Beide Gruppen hatten in diesem Experiment EAE mit derselben Stärke von 3,5 und Inzidenz. Der durchschnittliche Beginn ist jedoch bei TCR.Tg4 mit Tag 9 etwa 3 Tage früher als bei B10.PL. Obwohl hier die Sterblichkeitsrate in B10.PL höher war, war diese in anderen Experimenten eher bei TCR.Tg4 höher, und die Erkrankung dort eher stärker. Da in densel-

ben Gruppen bei unterschiedlichen Experimenten Schwankungen vorkommen, sind die Ergebnisse verschiedener Experimente nicht unbedingt direkt vergleichbar.

Grad	Klinische Anzeichen
0	Normal, keine offenbaren Krankheitszeichen
1	Gelähmter Schwanz oder Hinterbeinschwäche (Maus stolpert durch Käfigdeckel-Gitterstäbe)
2	Gelähmter Schwanz und Hinterbeinschwäche
3	Partielle Hinterbein-Paralyse (Maus kann nicht mehr normal laufen, jedoch noch zum gewissen Grad die Hinterbeine bewegen, verzögerter Aufstehreflex)
4	Vollständige Hinterbeinparalyse (Maus bewegt sich nur noch mit Vorderbeinen fort)
5	Tot durch EAE oder kurz vor dem Sterben, wird getötet

**Tabelle 5: Einteilung klinischer Anzeichen von EAE;** übernommen von Current Protocols in Immunology vol.3 (Coligan, 1994)



Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>1</sup>	Mittleres Maximum <sup>2</sup>	Tot <sup>3</sup>
B10.PL	6/6	12 ± 1	3,5 ± 1,5	2 (15;16)
TCR.Tg4	4/4	9 ± 1	3,5 ± 0,6	0

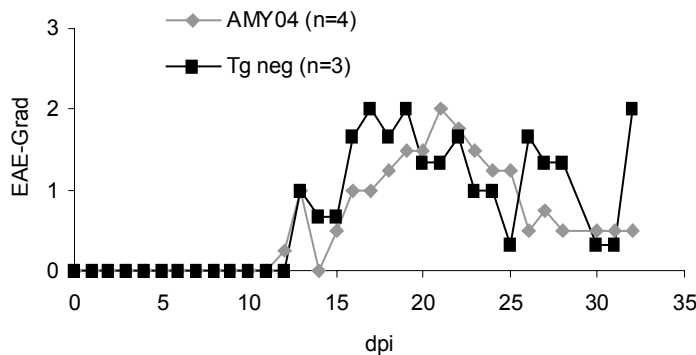
- 1 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven mit Standardabweichung
- 2 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung
- 3 Tote wurden aus der weiteren Wertung für die Kurven rausgenommen; Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere

**Abb. 24: EAE-Induktion in B10.PL und TCR.Tg4.** Aktive EAE-Induktion mit Peptid (Ac1-10) in CFA und Pertussistoxin. Die Kurven zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen.

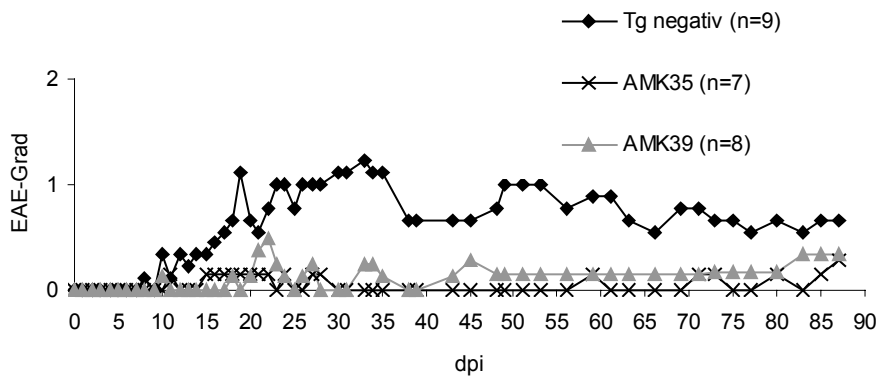
Die Ergebnisse der EAE-Induktion in einzeltransgenen AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> sind in Abb. 25 gezeigt. Die einzeltransgenen Tiere der Linie AMY<sub>04</sub> in Exp. 1 sind nicht tolerant gegenüber EAE-Induktion. Die Stärke, Inzidenz und der durchschnittliche Beginn sind etwa gleich in beiden Gruppen. Von den einzeltransgenen Tieren der Linie AMK<sub>39</sub> (Exp. 2) bekamen 5 von 8 EAE zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen Tag 20 und Tag 80. Davon hatte ein Tier einen EAE-Grad von 3, eines von 2, und die drei anderen von 1. In den

beiden Tieren mit 3 und 2 war die Erkrankung auf wenige Tage (3; 6) begrenzt. Im Gegensatz dazu hatten 7 von 9 Tieren der Kontrollgruppe EAE der Stärke 2-4, wobei die Erkrankung bei den meisten etwa nach 20 Tagen begann und in mehreren Schüben länger andauerte. Von den Tieren der Linie AMK<sub>35</sub> bekamen nur 2 von 7 sehr schwach EAE. Beide hatten nur Grad 1 zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten.

## Exp. 1



## Exp. 2



Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>1</sup>	Mittleres Maximum <sup>2</sup>	Tot
Tg negativ (Exp1)	3/3	Tag 14	2,7 ± 1,5	0
AMY <sub>04</sub> (Exp.1)	4/4	Tag 15	2,8 ± 1,5	0
Tg negativ (Exp2)	7/9	Tag 20	2,3 ± 1,5	0
AMK <sub>35</sub> (Exp2)	2/7	Tag 37 (15; 59)	0,3 ± 0,5	0
AMK <sub>39</sub> (Exp2)	5/8	Tag 36	1 ± 1,1	0

1 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE, in Klammern Daten einzelner Tiere

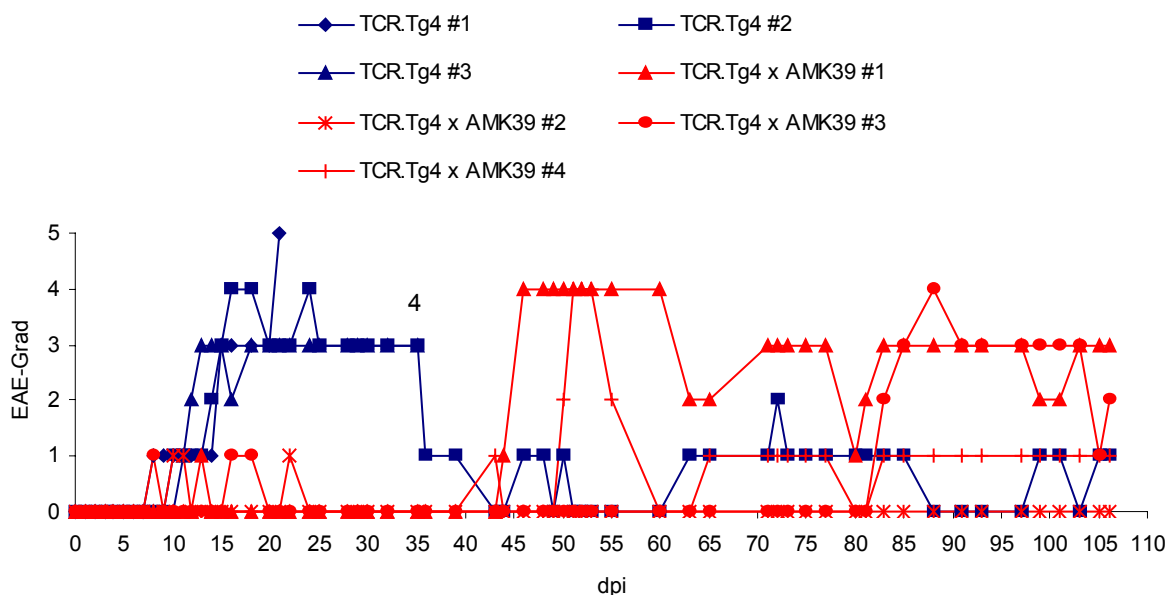
2 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung

**Abb. 25: EAE-Induktion in transgenen Tieren.** Aktive EAE-Induktion mit Peptid (Ac1-10) in CFA und Pertussis-toxin in zwei unterschiedlichen Experimenten. Die Kurven zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Alle Tiere waren heterozygot für H-2<sup>u</sup> (H-2<sup>dxu</sup> oder H-2<sup>bxu</sup>). Tg negative waren Geschwistertiere der anderen Gruppen. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen.

Dies zeigt, daß die Expression der Transgene in AMY<sub>04</sub> Tieren mit einem normalen T-Zellrepertoire nicht zur Toleranz führt. Das Transgen der Linie AMK<sub>35</sub> führt dazu, daß die

meisten Tiere tolerant sind und kein EAE bekommen. Tiere der Linie AMK<sub>39</sub> sind jedoch nur unvollständig tolerant gegenüber EAE-Induktion.

In Abb. 26 ist die EAE-Induktion von doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> gezeigt. Da einzelne Mäuse in diesem Experiment verstarben, bzw. früher aus dem Experiment genommen wurden, sind hier die Ergebnisse von einzelnen Tieren dargestellt.



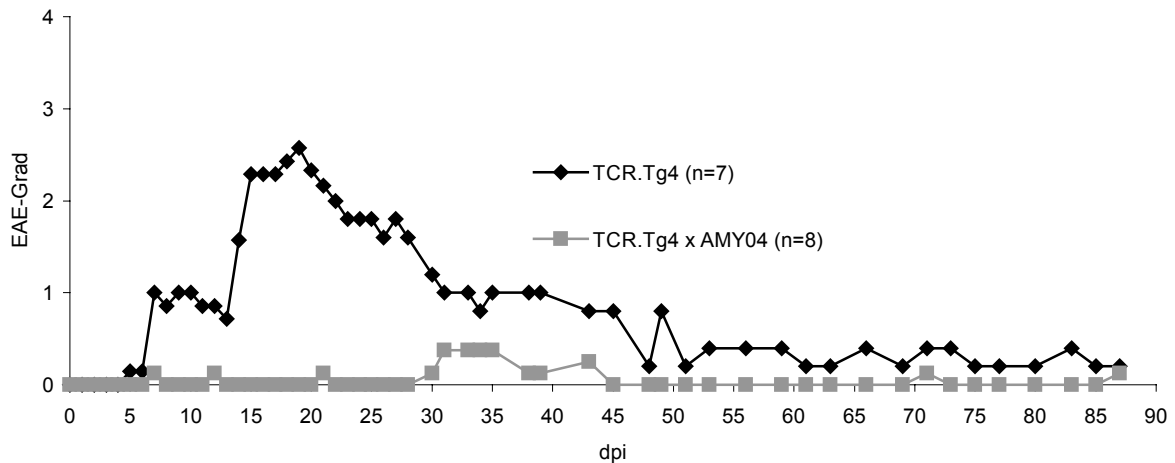
Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>1</sup>	Mittleres Maximum <sup>2</sup>	Tot <sup>3</sup>
TCR.Tg4	3/3	Tag 10	4 ± 1	1
TCR.Tg4 x AMK <sub>39</sub>	4/4	Tag 59	3,3 ± 1,5	0

- 1 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven
- 2 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung
- 3 Tote wurden aus der weiteren Wertung für die Kurven rausgenommen; Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere
- 4 TCR.Tg4 #3 wurde am Tag 35 mit EAE 3 aus dem Versuch rausgenommen

**Abb. 26: EAE-Induktion in doppeltransgenen Tieren.** Aktive EAE-Induktion mit Peptid (Ac1-10) in CFA und Pertussistoxin. Alle Tiere waren heterozygot für H-2<sup>u</sup> (H-2<sup>dxu</sup> oder H-2<sup>bxu</sup>). TCR.Tg4 waren Geschwistertiere der anderen Gruppe. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen.

Die doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> Tiere bekamen alle EAE mit einem relativ hohen durchschnittlichem Grad, jedoch zu einem viel späteren Zeitpunkt als die Kontrollgruppe. Der durchschnittliche Beginn lag hier bei Tag 59 im Vergleich zu Tag 10 bei den einzeltransgenen TCR.Tg4.

In Abb. 27 ist die EAE-Induktion in doppeltransgenen Tieren der Linie AMY<sub>04</sub> dargestellt. Hier zeigten auch in dem langen Zeitraum von 85 Tagen nur 3 von 8 Tieren EAE-Krankheitssymptome. Von diesen drei hatte eines einen kurzen Schub (4 Tage) mit EAE 3 und die anderen beiden hatten vereinzelte Tage mit EAE 1. Die doppeltransgenen Tiere der Linie AMY<sub>04</sub> sind somit tolerant gegen EAE-Induktion, während die einzeltransgenen Tiere kein Unterschied zu den Kontrollen zeigten.



Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>1</sup>	Mittleres Maximum <sup>2</sup>	Tot <sup>3</sup>
TCR.Tg4	6/7	Tag 8	3,1 ± 1,6	2 (19;22)
TCR.Tg4 x AMY <sub>04</sub>	3/8	Tag 37	0,6 ± 1,1	0

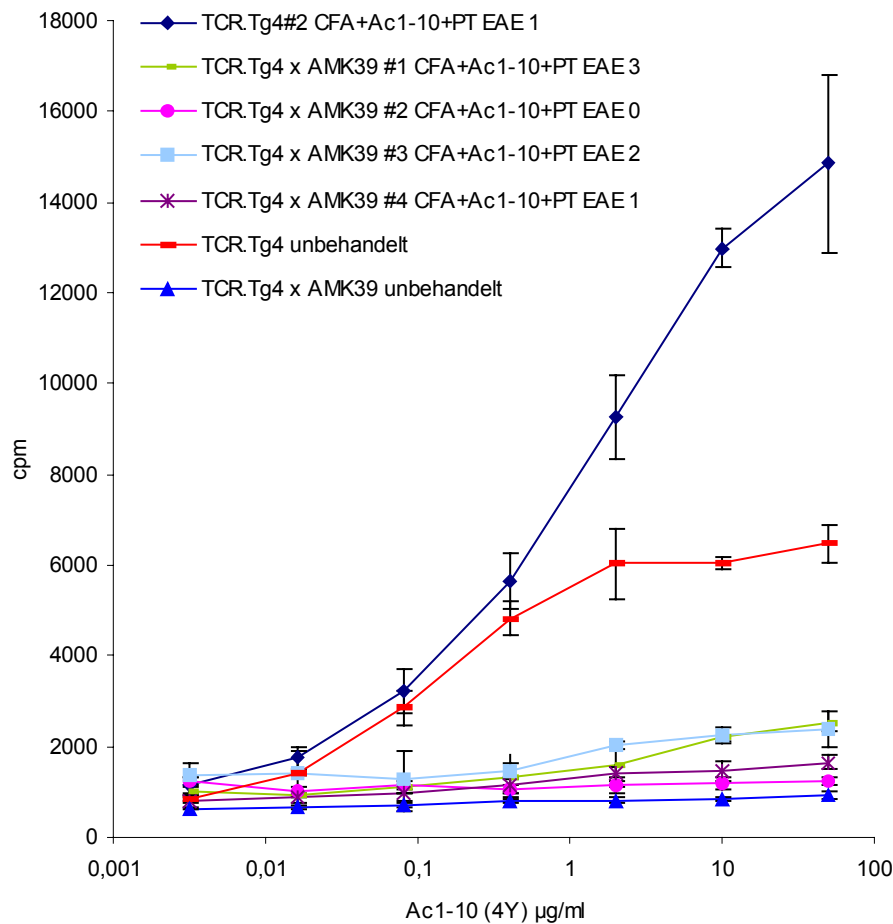
- 1 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven
- 2 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung
- 3 Tote wurden aus der weiteren Wertung für die Kurven rausgenommen; Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere

**Abb. 27: EAE-Induktion in doppeltransgenen Tieren.** Aktive EAE-Induktion mit Peptid (Ac1-10) in CFA und Pertussistoxin. Die Kurven zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Alle Tiere waren H-2<sup>b<sub>u</sub></sup>. TCR.Tg4 waren Geschwistertiere der anderen Gruppe. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen.

Die doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> bekamen eine späte Form von EAE, obwohl die Milzzellen zuvor absolut tolerant gegenüber Stimulation durch das MBP-Peptid waren. Um zu untersuchen, ob in den Tieren mit EAE die Toleranz systemisch gebrochen worden war, wurde nach Beendigung des Experimentes aus Abb. 26 ein Proliferationsexperiment mit Milzzellen durchgeführt. Wie die Abb. 28 zeigt ist die Reaktivität der Kontrolle TCR.Tg4 mit EAE 1 deutlich stärker als die vom unbehandelten TCR.Tg4 Kontrolltier. Der Vergleich von doppeltransgenen Mäusen mit EAE 3 und 2 mit doppeltransgenen, die kein EAE hatten, oder unbehandelt waren, zeigt, daß diese eine leicht erhöhte Reaktivität haben, die jedoch deutlich schwächer als die von einzeltransgenen TCR.Tg4 ist. Dies zeigt, daß in diesen Tieren zumindest zu diesem Zeitpunkt keine systemische Brechung von Toleranz stattfindet. Entweder waren die Zellen nur zu einem kurzen Zeitraum systemisch reaktiv, oder die reaktiven Zellen sind nur lokal in den Geweben des Zentralen Nervensystems zu finden.

Um zu testen, ob die CD4-Zellen in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> auf die EAE-Induktion reagieren, wurden doppeltransgene Tiere mit Peptid in CFA und Pertussistoxin, sowie als Kontrolle mit PBS in CFA und Pertussistoxin behandelt und nach 18 Tagen wurde eine FACS-Analyse, sowie ein Proliferationsversuch durchgeführt. Die Abb. 29a zeigt, daß die CD4-Zellen aus Lymphknoten durch die EAE-Induktion von 5 auf 12% expandiert sind. Überraschenderweise sind jedoch auch die CD4-Zellen der Tiere, die nur mit CFA und Pertussistoxin behandelt wurden, auf 15% expandiert. Auch die Färbung der Aktivierungsmarker CD25, CD44, und CD62L zeigt, daß der ohnehin schon große Anteil aktivierter CD4-Zellen in

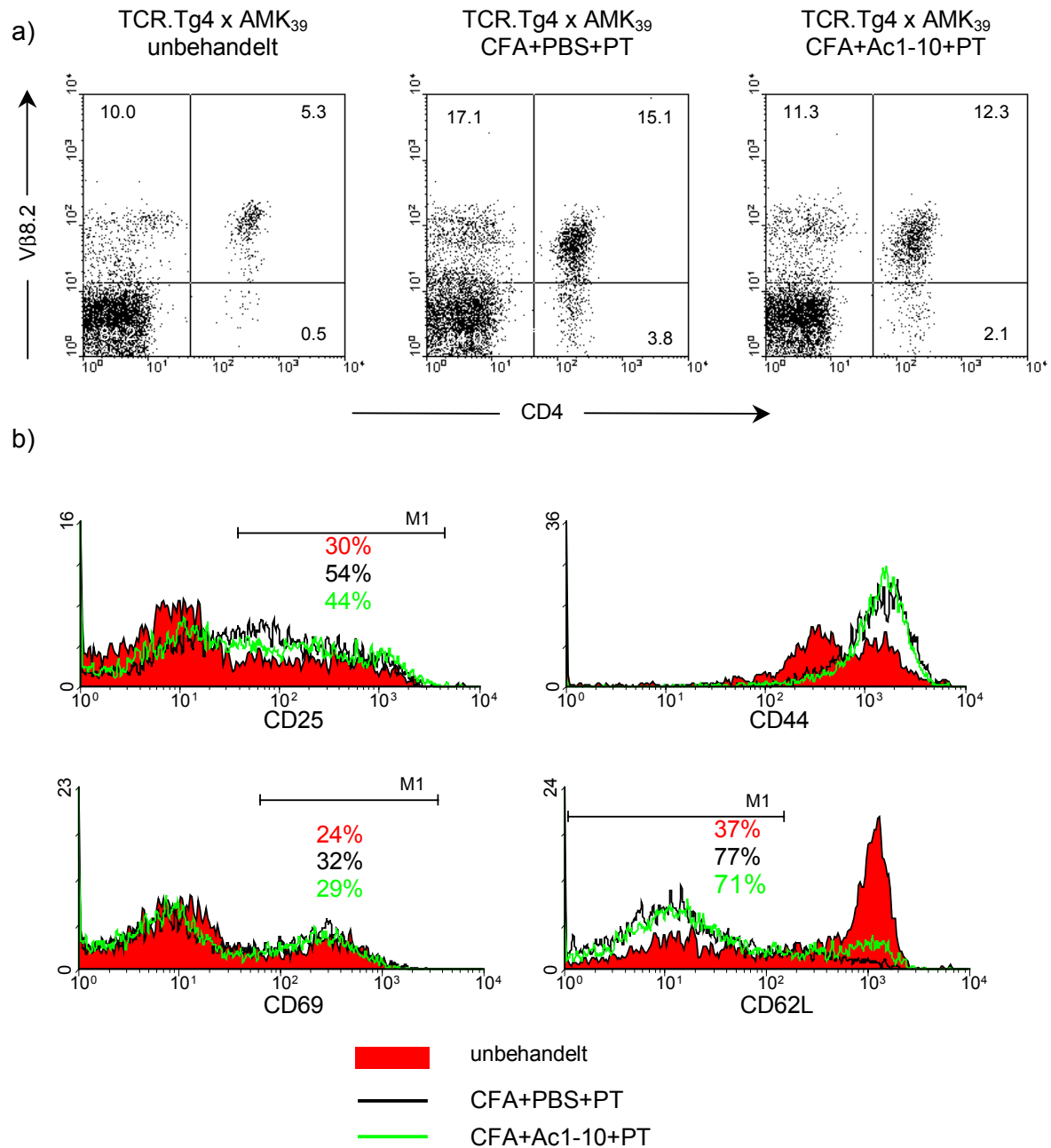
TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> durch die Behandlung sowohl mit, als auch ohne Peptid deutlich steigt. Nur der Anteil an CD69 positiven Zellen erhöht sich durch beide Behandlungen kaum.



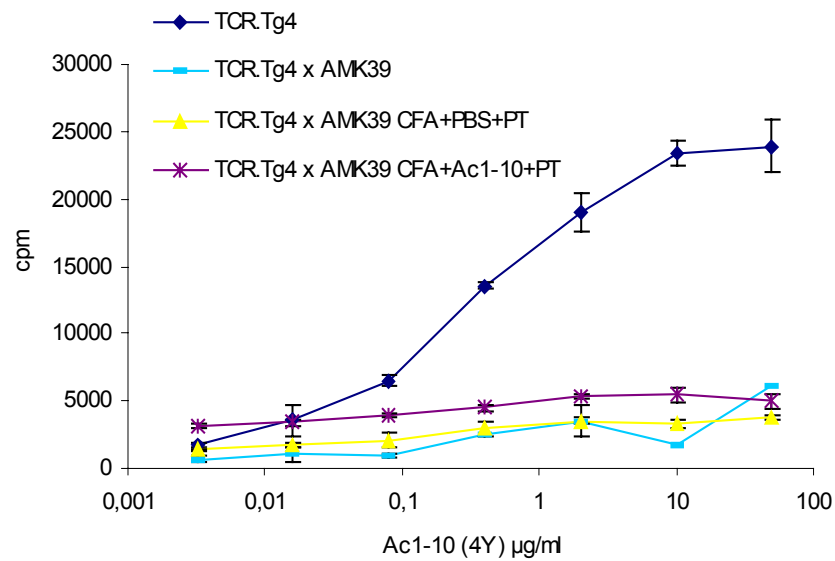
**Abb. 28: In vitro-Reaktivität von Milzzellen aus doppeltransgenen Tieren mit EAE nach Immunisierung.** Milzzellen der immunisierten Tiere (Tiere aus Abb. 26) wurden nach Beendigung des Experiments (Tag 106) auf in vitro-Reaktivität getestet. Zu je  $3 \times 10^5$  Zellen wurde das bezeichnete Peptid titriert, d.h. das Peptid wurde von den endogenen APC's präsentiert. Die Proliferation wurde über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt (siehe Methoden). Die Tiere waren H-2<sup>b<sub>xu</sub></sup> (TCR.Tg4 #2; TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> #4) oder H-2<sup>u</sup> (TCR.Tg4 unbehandelt) und die anderen H-2<sup>d<sub>xu</sub></sup>. Der in der Legende angegebene Erkrankungsgrad bezieht sich auf den letzten gemessenen Zeitpunkt kurz vor dem Töten der Tiere.

Der Proliferationsversuch in Abb. 30 zeigt trotz der starken Expansion am Tag 18 nach Induktion keine erhöhte in vitro-Reaktivität von Lymphknotenzellen der behandelten Tiere. Die CD4-Zellen doppeltransgener TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> Tiere lassen sich demnach durch EAE-Induktion unspezifisch aktivieren, sind jedoch nicht in vitro reaktiv gegen das MBP-Peptid, und sind in vivo zumindest in den ersten 40 bis 50 Tagen tolerant gegen EAE-Induktion.





**Abb. 29: Expansion und Aktivierung von CD4-Zellen doppeltransgener Tiere durch CFA und Pertussistoxin.** Die Tiere wurden am Tag 0 mit CFA und PBS bzw. Ac1-10 immunisiert. Pertussistoxin wurde am Tag 1 und 3 gegeben. **a)** FACS-Analyse von PBL's, 17 Tage nach Immunisierung. **b)** FACS-Analysen von Lymphknoten-zellen 18 Tage nach Immunisierung. Die Zellen sind elektronisch gegatet auf CD4-Zellen. Färbungen: F23.1-FITC ( $\alpha$ V $\beta$ 8.2), CD4-613 und gegen die jeweils aufgetragenen Aktivierungsmarker mit biotinylierten Antikörpern und SA-PE. Die Prozentangaben unter den Markern bezeichnen den Anteil der Zellen im jeweiligen Marker des Histogramms. Rot: unbehandelt; Schwarz: CFA+PBS+PT; grün: CFA+Ac1-10+PT.



**Abb. 30: Keine erhöhte in vitro-Reaktivität von Lymphknotenzellen aus doppeltransgenen Tieren nach Immunisierung.** Lymphknotenzellen der behandelten Tiere wurden 18 Tage nach Immunisierung auf in vitro-Reaktivität getestet. Zu je  $1,5 \times 10^5$  Zellen wurde das bezeichnete Peptid titriert, d.h. das Peptid wurde von den endogenen APC's präsentiert. Die Proliferation wurde über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt (siehe Methoden). Die Tiere waren H-2<sup>dxu</sup> oder H-2<sup>bxu</sup>.

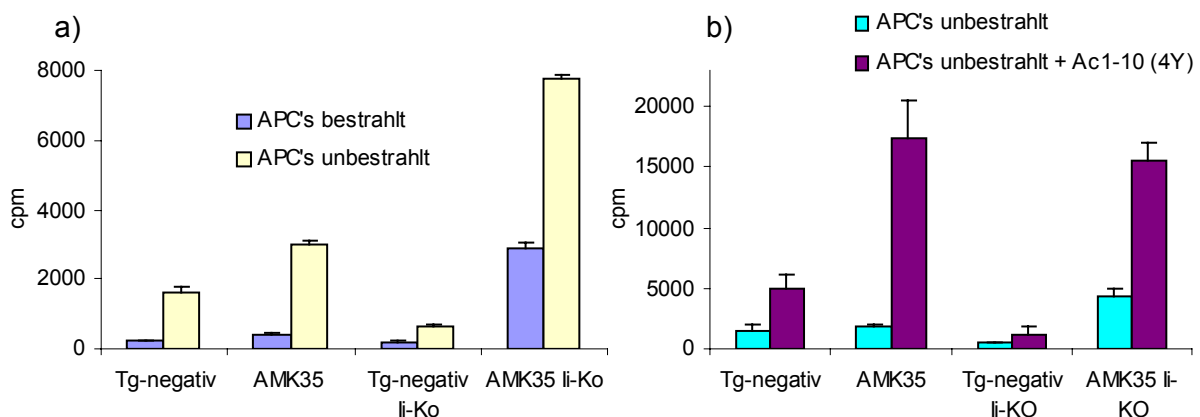
*In Tieren mit einem wt-T-Zellrepertoire führte die Expression der Transgene in den AMK Linien größtenteils zur Toleranz gegen EAE-Induktion. AMY<sub>04</sub>-Tiere mit einem normalen T-Zellrepertoire zeigten jedoch keinen Unterschied bei der EAE-Induktion im Vergleich zu Kontrollen. In doppeltransgenen Tieren auf einem TCR-transgenen Hintergrund führte die Expression der Transgene in vitro bei allen drei Linien zur Toleranz gegenüber Peptidstimulation. In vivo waren doppeltransgene Tiere der Linien AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> partiell tolerant gegenüber EAE-Induktion.*

*Dies zeigt, daß die Expression der Transgene einen maßgeblichen Einfluß auf die Reaktivität der T-Zellen in vitro und in vivo sowohl in einem wt-, als auch in einem TCR-transgenen Repertoire hat.*

### 5.2.3 Funktionelle Expression der Transgene in der Peripherie

#### 5.2.3.1 Aktivierung von TCR.Tg4-T-Zellen in vitro

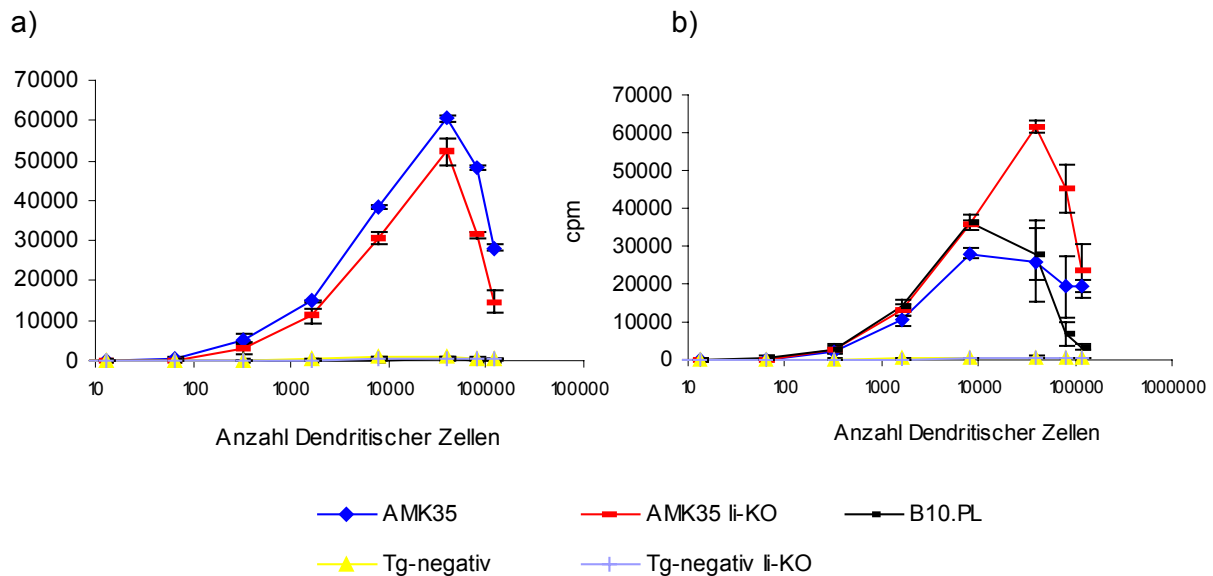
Um die Funktionalität des transgenen Peptid-MHC-Konstruktes zu testen, wurde mit Milzzellen der Linie AMK<sub>35</sub> ein Proliferationsversuch mit TCR.Tg4 T-Zellen durchgeführt. Es sollte zum einen getestet werden, ob das transgene MHC-Molekül das kovalente MBP-Peptid direkt präsentiert und dadurch T-Zellen aktiviert, und zum anderen, ob das transgene MHC-Molekül mit exogenem Peptid beladen werden kann (Abb. 31). Da erste Experimente mit bestrahlten APC's nur eine sehr schwache, die in vivo Aktivierungsexperimente jedoch eine sehr starke Proliferation von TCR.Tg4 Zellen zeigten, wurden auch unbestrahlte Milzzellen als APC's verwendet. Wie in Abb. 31a zu sehen, werden TCR.Tg4 T-Zellen durch bestrahlte AMK<sub>35</sub> nicht, und durch unbestrahlte AMK<sub>35</sub> Milzzellen nur schwach aktiviert. Auf li-ko Hintergrund bewirken bestrahlte AMK<sub>35</sub>-Milzzellen eine mäßige, und nicht bestrahlte eine deutliche Aktivierung von TCR.Tg4 Zellen.



**Abb. 31: Milzzellen von AMK<sub>35</sub> aktivieren TCR.Tg4 T-Zellen in vitro und präsentieren exogenes Peptid. a)** 72h-Proliferationsversuch mit bestrahlten und unbestrahlten APC's. B-Zell depletierte TCR.Tg4 T-Zellen ( $2 \times 10^5$ ) wurden mit bestrahlten oder unbehandelten Milz-Zellen (APC's;  $2 \times 10^5$ ) der angegebenen Tiere inkubiert. Gemessen wurde die Proliferation anhand des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus in den letzten 48 Stunden des Versuchs. Unbestrahlte APC's alleine waren alle unter 1200 cpm. **b)** 48h Proliferationsversuch. B-Zell depletierte TCR.Tg4 T-Zellen ( $2 \times 10^5$ ) wurden mit unbestrahlten Milz-Zellen (APC's;  $2 \times 10^5$ ) der angegebenen Tiere mit oder ohne Peptid (10µg/ml) inkubiert. Zur Bestimmung der Eigenproliferation der unbestrahlten APC's wurden diese mit bestrahlten TCR.Tg4-Zellen inkubiert (nicht gezeigt, alle Werte <1100cpm). Gemessen wurde die Proliferation anhand des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus in den letzten 24 Stunden des Versuchs. Der Werte der Proliferation von B-Zell depletierten TCR.Tg4-Zellen alleine mit Peptid (durch restliche APC's, nicht gezeigt 4250 cpm) wurde von den Proliferationswerten bei Peptidzugabe abgezogen. Für a) und b) wurde dieselbe APC-Zell-Präparation benutzt. Das Tier für Tg-negativ li-ko war H-2<sup>dd</sup>, alle anderen waren H-2<sup>dx</sup>.

Um zu testen, ob das transgene MHC-Molekül in AMK<sub>35</sub> auch exogenes Peptid präsentieren kann, wurde den APC's das hochaffine MBP-Peptid Ac1-10 (4Y) zugegeben. Die T-Zellen wurden damit sowohl durch das transgene niedrigaffine, als auch durch das exogene hochaffine MBP-Peptid stimuliert. Abb. 31b zeigt, daß unbestrahlte APC's von AMK<sub>35</sub> sowohl auf li-wt als auch auf li-ko Hintergrund das exogene Peptid sehr gut präsentieren können.

Da reife Dendritische Zellen die APC's sind, welche am besten naive T-Zellen aktivieren können, wurde ein Proliferationsversuch mit Dendritischen Zellen, gewonnen aus Knochenmarkszellen (BM-DC's), durchgeführt (Abb. 32). Für diesen Versuch wurden unterschiedliche Anzahlen von LPS-aktivierten Dendritischen Zellen aus AMK<sub>35</sub> auf wt-, und li-ko Hintergrund mit einer konstanten Anzahl von TCR.Tg4 Zellen inkubiert.



**Abb. 32: LPS-stimulierte Dendritische Zellen von AMK<sub>35</sub> aktivieren TCR.Tg4 Zellen in vitro.** Dendritische Zellen wurden aus Knochenmarkszellen der bezeichneten Mäuse durch GM-CSF-Zugabe gewonnen und mit LPS (1 µg/ml) 24h stimuliert. (siehe Abb. 16). Die TCR.Tg4-Zellen wurden 4x B-Zell-depletiert und mit Dynabeads von MHC-Klasse II<sup>+</sup> Zellen depletiert (siehe Methoden). **a)** TCR.Tg4-Zellen (je  $2 \times 10^5$ ) wurden inkubiert mit titrierten Zellzahlen der bezeichneten Dendritischen Zellen (0, 13, 64, 320, 1600, 8000, 40000, 80000 und 120000 Zellen). **b)** 4h vor der LPS-Zugabe wurde zu den Dendritischen Zellen das Peptid Ac1-10 (4Y) in einer Konzentration von 5 µg/ml gegeben. Vor dem Proliferationsversuch wurden die Dendritischen Zellen gewaschen um restliches Peptid im Medium zu entfernen. Für a) und b) wurden die Dendritischen Zellen bestrahlt, und für 60h mit TCR.Tg4-Zellen inkubiert. In den letzten 36h wurde <sup>3</sup>H-Thymidin zugegeben. Alle Tiere, aus denen Knochenmark entnommen wurde, waren H-2<sup>bxd</sup>.

Ohne Peptidzugabe (Abb. 32a) führen die transgenen BM-DC's zu einer drastischen Proliferation der T-Zellen. Dabei stimulieren die Zellen mit li-ko Hintergrund nicht besser als die li-wt Zellen. Schon bei der sehr niedrigen Zellzahl von 320 Dendritischen Zellen / Well ist eine signifikante Aktivierung erkennbar. Mit 40000 Zellen wird die stärkste Proliferation erreicht. Bei einer höheren Anzahl Dendritischer Zellen sinkt die Proliferation wieder. Dies ist wahrscheinlich auf Apoptose der TCR.Tg4 T-Zellen zurückzuführen, hervorgerufen durch eine zu starke Antigenstimulation (Critchfield et al., 1994).

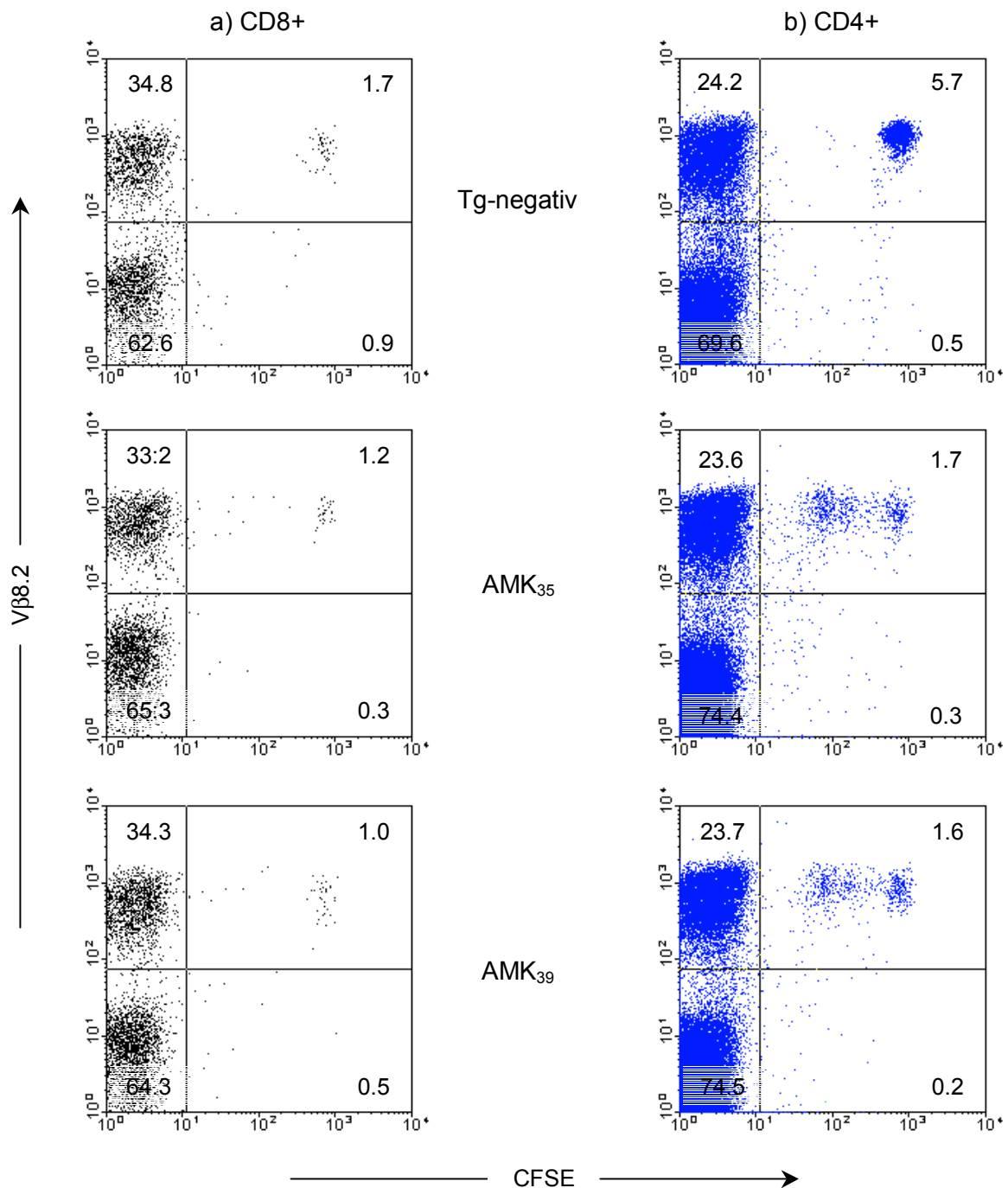
Um einen Vergleich mit der stimulatorischen Kapazität von wt I-A<sup>u</sup> zu haben, und zu testen ob auch das transgene I-A<sup>u</sup> auf Dendritischen Zellen mit exogenem Peptid beladen werden kann, wurde den Dendritischen Zellen bereits 4h vor der LPS-Aktivierung das Peptid Ac1-10 (4Y) zugegeben (Abb. 32b). Die mit Peptid beladenen BM-DC's von B10.PL stimulieren die T-Zellen in ähnlicher Weise wie die transgenen BM-DC's. Die Kurve erreicht ihr Maximum jedoch schon bei 8000 Zellen. Ähnlich verhalten sich die exogen beladenen AMK<sub>35</sub>

Zellen auf li-wt Hintergrund. Die Stimulation mit exogen beladenen AMK<sub>35</sub> x li-ko BM-DC's hat ihr Maximum wieder bei 40000 Zellen und ist leicht erhöht. Dies zeigt, daß auch das transgene MHC auf Dendritischen Zellen von li-ko Tieren noch mit exogenem Peptid beladen werden kann.

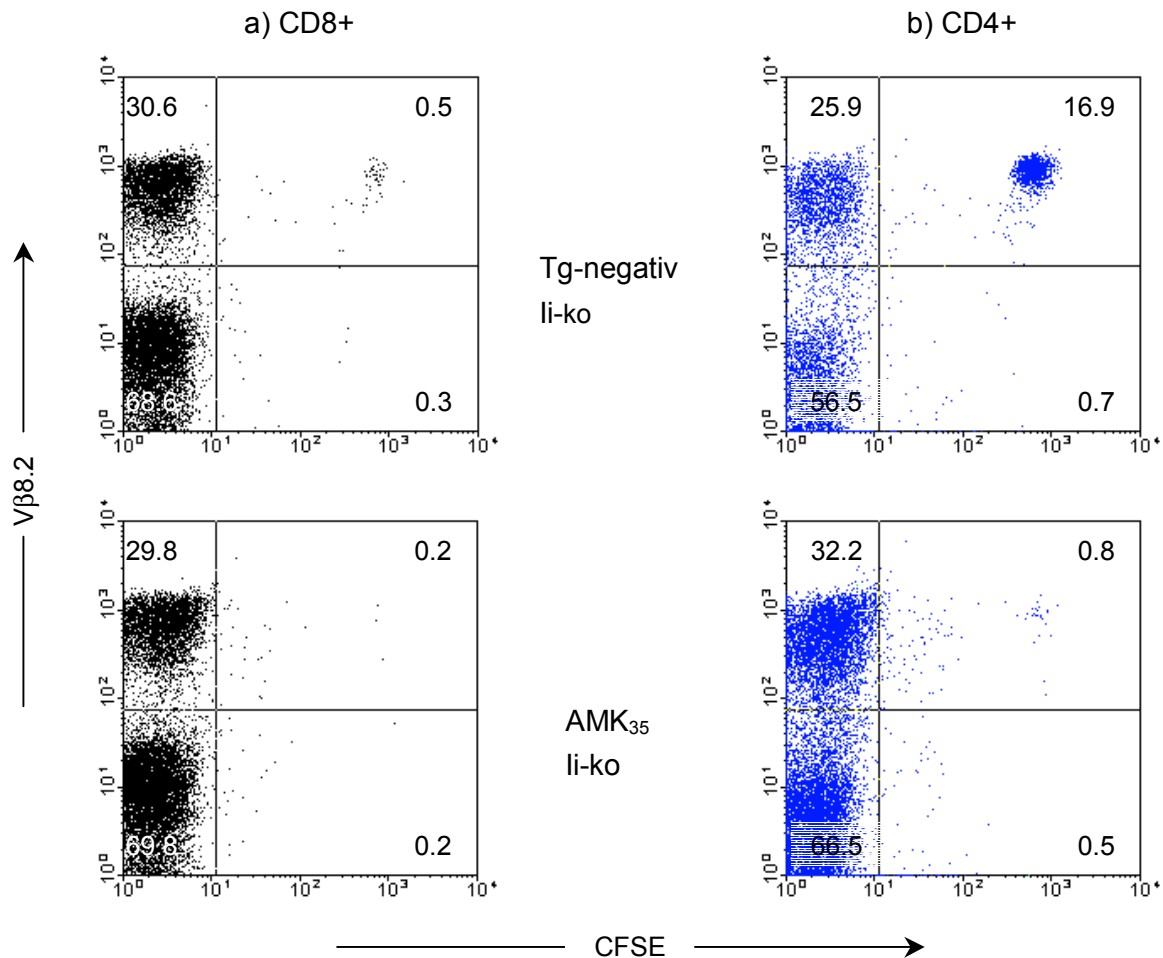
#### 5.2.3.2 Aktivierung von TCR.Tg4 T-Zellen in vivo

Um die periphere Expression in vivo zu untersuchen wurden TCR.Tg4 T-Zellen mit dem fluoreszierenden Lebendfarbstoff CFSE markiert, und intravenös in transgene Tiere injiziert. Die injizierten Zellen migrieren in wenigen Stunden in Lymphknoten und Milz. Durch Teilung der Zellen verdünnt sich der Farbstoff und es entstehen Zellen mit einer niedrigeren Fluoreszenz. Den injizierten Mäusen wurde 42h nach der Injektion die Lymphknoten und die Milz entnommen und eine FACS-Analyse durchgeführt. Abb. 33 zeigt, daß spezifisch die CD4<sup>+</sup>Vβ8.2-positiven TCR.Tg4 Zellen in den Lymphknoten der transgenen Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> proliferiert haben (Population oben rechts). Da die Färbungen von Milz ähnlich waren, sind diese nicht gezeigt. Die Population oben links in den Dotblots stellt endogene, nicht TCR-transgene T-Zellen dar, die die endogene Vβ8.2-Kette exprimieren. Von den verschiedenen, abgestuften CFSE-positiven Populationen ist zu schließen, daß sich die Zellen in beiden Linien während der 42h bis zu 3 mal geteilt haben. Wenn man eine bestimmte Zeit für die Migration der T-Zellen aus der Blutzirkulation zu den APC's in den peripheren Lymphknoten mit einberechnet, stimmt dies gut mit der Schätzung überein, daß T-Zellen etwa 18h nach Antigenstimulation mit der Proliferation beginnen und sich dann ca. alle 6h teilen (Abbas et al., 2000).

Um den Einfluß des li-ko Hintergrundes auf die in vivo Aktivierung von TCR.Tg4 Zellen zu untersuchen, wurden markierte Zellen in AMK<sub>35</sub> x li-ko Mäuse injiziert (Abb. 34). Anstelle der erwarteten Proliferation in transgenen Tieren waren die Zellen jedoch größtenteils verschwunden. Die Färbung mit einem MHC Klasse I spezifischen Antikörper zur Unterscheidung zwischen transferierten und endogenen Zellen zeigte keine Anhäufung von transferierten CFSE-negativen Zellen (nicht gezeigt). Da dies in 3, voneinander unabhängigen, Experimenten gefunden wurde, kann auch ein Fehler bei der Injektion ausgeschlossen werden. Daß die Zellen durch fehlende MHC-Klasse II Stimulation auf li-ko Hintergrund abgestorben sind (Kirberg et al., 1997; Viret et al., 1999), kann ausgeschlossen werden, da in der transgen negativen Kontrolle eine große nicht proliferierende, lebende Population (Tote Zellen verlieren die CFSE-Markierung) erhalten blieb. Als einzige Schlußfolgerung bleibt, daß die TCR.Tg4 T-Zellen durch zu starke Aktivierung mittels Apoptose deletiert wurden. Dies würde mit den in vitro-Aktivierungsdaten mit Milzzellen korrelieren, die eine bessere Stimulation durch Zellen auf li-ko Hintergrund zeigten, und im Gegensatz zu den Daten mit Dendritischen Zellen stehen. Die Reduktion der transferierten Zellen war nicht nur bei CD4-, sondern auch bei transferierten CD8-Zellen zu beobachten. Dies war auch in drei voneinander unabhängigen Experimenten zu sehen.



**Abb. 33: Aktivierung von CFSE-markierten TCR.Tg4 T-Zellen in vivo.** TCR.Tg4-Milz und Lymphknotenzellen wurden von B-Zellen und MHC Klasse II<sup>+</sup> Zellen depletiert und CFSE markiert. In die bezeichneten Mäuse wurden je  $1 \times 10^7$  Zellen i.v. injiziert. Nach 42h wurden Milz und Lymphknoten-Zellen der injizierten Mäuse entnommen und eine FACS-Analyse durchgeführt. Die Dotblots zeigen Lymphknotenzellen. Die Färbungen mit Milzzellen waren ähnlich (nicht gezeigt). **a)** Zellen elektronisch auf CD8<sup>+</sup> gegatet, gefärbt gegen Vβ8.2 mit F23.1-bio/SA-PE. **b)** Zellen elektronisch auf CD4<sup>+</sup> gegatet, gefärbt gegen Vβ8.2 mit F23.1-bio/SA-PE. CD8 bzw. CD4 wurde mit direkt an Red613 gekoppelten Antikörpern gefärbt. Die TCR.Tg4-Donor Tiere waren H-2<sup>u</sup>, die Rezipienten waren H-2<sup>bxd</sup>. Bei der Organentnahme zeigten die AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> Mäuse vergrößerte Milzen und geschwollene Lymphknoten. Das Experiment wurde 3 mal durchgeführt mit ähnlichen Ergebnissen.



**Abb. 34: Deletion von CFSE-markierten TCR.Tg4 T-Zellen in vivo in AMK<sub>35</sub> auf li-ko Hintergrund.** Versuch wie in Abb. 33 beschrieben. Die Dotblots zeigen Lymphknotenzellen. Die Färbungen mit Milzzellen waren ähnlich (nicht gezeigt). **a)** Zellen elektronisch auf CD8<sup>+</sup> gegatet. **b)** Zellen elektronisch auf CD4<sup>+</sup> gegatet. Die TCR.Tg4-Donor Tiere waren H-2<sup>u</sup>, die Rezipienten waren H-2<sup>bxd</sup>. Das Experiment wurde 3 mal durchgeführt mit ähnlichen Ergebnissen. Eine Färbung mit MHC Klasse I K<sup>d</sup>-spezifischen Antikörper zur Unterscheidung von transferierten und endogenen Zellen zeigte keine Anhäufung von CFSE negativen transferierten CD4<sup>+</sup> Zellen in den AMK<sub>35</sub> li-ko Tieren (nicht gezeigt).

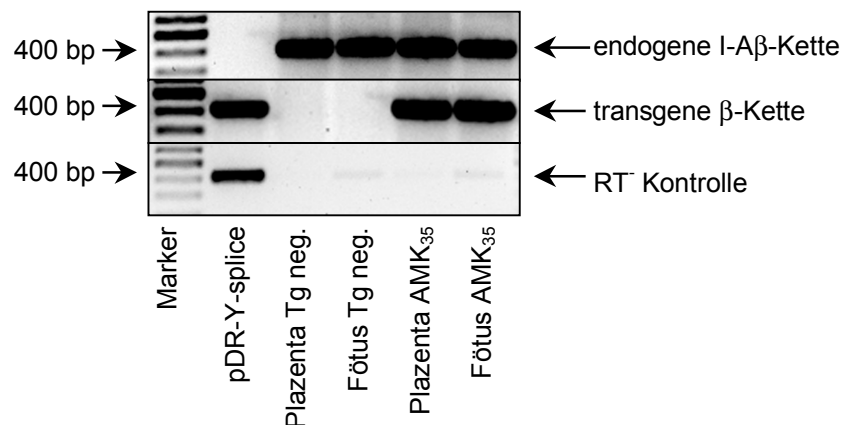
Die Proliferationsexperimente *in vitro* mit Milzzellen und Dendritischen Zellen sowie *in vivo* mit transferierten T-Zellen zeigen, daß die Transgene in den Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> in der Peripherie exprimiert werden. Trotz dem Vorhandensein der Invarianten Kette, und einem Peptid mit niedriger Affinität zum MHC-Molekül werden die TCR.Tg4 Zellen *in vivo* stark aktiviert. Da in diesen Tieren kein endogenes I-A<sup>u</sup> exprimiert ist, und die transferierten Zellen von MHC II-positiven Zellen depletiert wurden, und daher ein Abbruchprodukt der  $\beta$ -Kette nicht präsentiert werden könnte, müssen beide transgene Ketten korrekt exprimiert werden. Die Transgene werden somit funktionell in der Peripherie exprimiert und können daher in den Schwangerschaftsexperimenten eingesetzt werden.

### 5.3 Einfluß der fötalen Expression des Transgenes auf die Induktion von EAE während der Schwangerschaft

Die transgenen Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> wurden generiert, um die Hypothese zu überprüfen, daß die Expression eines Autoantigenes durch den Fötus die Autoimmunerkrankung der Mutter positiv beeinflusst. Dazu wurden einige Vorexperimente, sowie erste Experimente mit den transgenen Linien durchgeführt.

#### 5.3.1 Transgen-Expression in Plazenta und Fötus

Um zu testen, ob die Transgene überhaupt in Plazenta oder Embryo auf mRNA-Ebene exprimiert werden, wurde eine RT-PCR mit Plazenta und Fötus-Gewebe von Tag 14 der Linie AMK<sub>35</sub> durchgeführt (Abb. 35).



**Abb. 35: RT-PCR von Plazenta und Fötus.** Fötus und Plazenta entnommen am Tag 14 von transgen-negativen Weibchen, verpaart mit einem transgen negativen Männchen (Tg neg.) bzw. einem transgen homozygoten Männchen der Linie AMK<sub>35</sub>. PCR von cDNA gewonnen aus RNA der angezeigten Organe. Die Organe wurden nicht perfundiert. Die RT<sup>-</sup> Kontrolle wurde mit Primern spezifisch für die transgene β-Kette durchgeführt.

Die RT-PCR zeigt deutlich, daß die transgene β-Kette in AMK<sub>35</sub> auf mRNA-Ebene sowohl in Plazenta, als auch in Fötus am Tag 14 exprimiert wird.

#### 5.3.2 Vorexperimente

Um zu testen, ob EAE in der frühen Schwangerschaft in Mäusen induziert werden kann, wurde ein Vorexperiment mit TCR.Tg4 und B10.PL Tieren durchgeführt (Tabelle 6). Die in dem Experiment eingesetzten Männchen waren nichttransgene B10.PL. Die Weibchen wurden verpaart und auf Vaginalpfropf (VP) untersucht. In VP<sup>+</sup> Weibchen wurde nach 4 Tagen EAE induziert. Wie die Tabelle 6 zeigt waren von 17 VP<sup>+</sup>Tieren in drei unterschiedlichen Gruppen, in denen EAE induziert, bzw. denen als Kontrolle CFA und Pertussistoxin (PT) gegeben wurde, nur 2 Tiere nachweislich schwanger. Das heißt, daß diese Tiere entweder trotz Vaginalpfropf nicht schwanger waren, oder die Schwangerschaft durch die Behandlung mit



CFA und PT verloren hatten. In der Gruppe der VP-negativen, die nicht behandelt wurde, hatten 6 von 17 Tieren Würfe. Diese Tiere hatten demnach ihren Vaginalpfropf bereits vor der Untersuchung verloren. Normalerweise haben ca. 50-80% der Tiere mit Vaginalpfropf Würfe. Daß die VP-positiven, behandelten Gruppen nur 2 Würfe hatten, spricht dafür, daß die Behandlung mit CFA und PT in der frühen Phase der Schwangerschaft bei den meisten Tieren zum Abort führt.

Gruppe	Schwanger <sup>1</sup>	Inzidenz	Beginn <sup>2</sup>	Mittleres Maximum <sup>3</sup>	Tot <sup>4</sup>
B10.PL verpaart mit B10.PL VP <sup>+</sup> (CFA+K)	1/7	7/7	10 ± 1	3,6 ± 1,5	2 (11;15)
TCR.Tg4 verpaart mit B10.PL VP <sup>+</sup> (CFA+K)	1/4	4/4	8 ± 2	3,3 ± 0,5	0
B10.PL verpaart mit B10.PL VP <sup>+</sup> (CFA+PBS)	0/6	0/6	-	-	-
TCR.Tg4 oder B10.PL ver- paart, VP <sup>-</sup>	6/17	0/17	-	-	-

1 Wurf bzw. Föten in getöteten

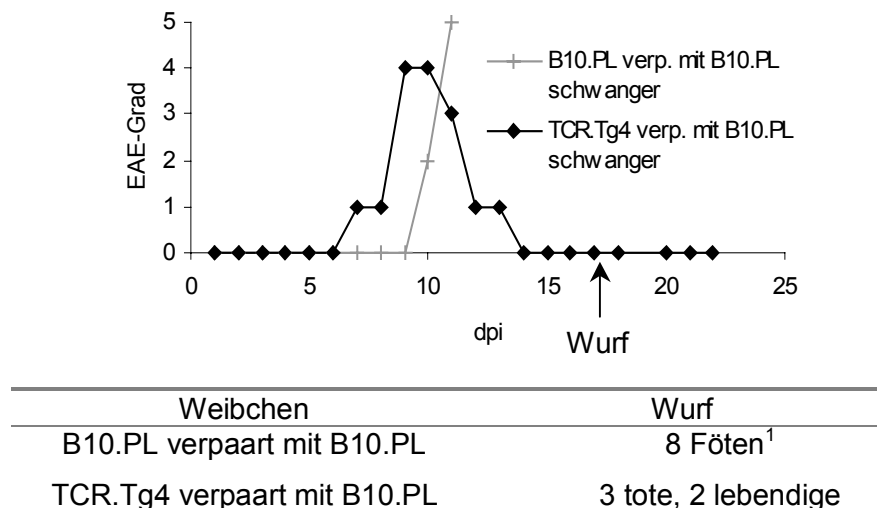
2 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven mit Standardabweichung

3 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung

4 Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere

**Tabelle 6: Frühe EAE-Induktion in verpaarten B10.PL und TCR.Tg4-Weibchen.** B10.PL-bzw. TCR.Tg4 Weibchen wurden verpaart und jeden Morgen auf Vaginalpfropf (VP) untersucht. VP-positive wurden entpaart und 4 Tage später wurde EAE mit Peptid (Ac1-10) in CFA induziert (Tag 0 dpi). Pertussistoxin wurde am Tag 1 und 3 (dpi) gegeben.

Der Verlauf von EAE in den zwei Tieren, die in Tabelle 6 schwanger wurden, ist in Abb. 36 dargestellt.



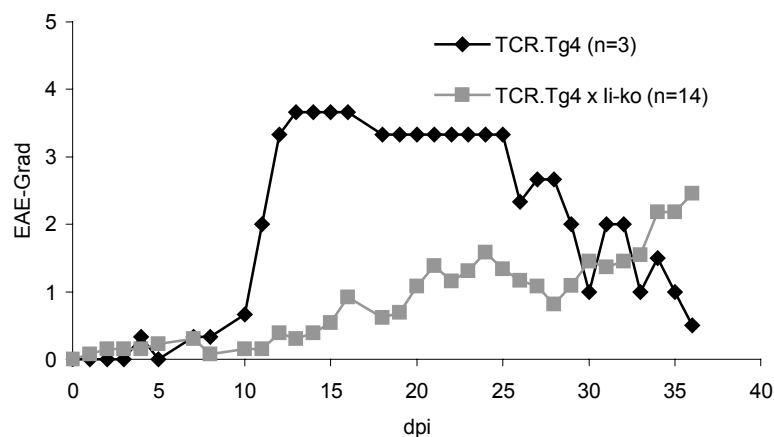
1 Das B10.PL Weibchen mußte wegen EAE am Tag 15 der Schwangerschaft getötet werden

**Abb. 36: EAE in schwangeren B10.PL und TCR.Tg4 Weibchen.** Kurven von schwangeren Einzeltieren aus Tabelle 6.

Beide Tiere hatten EAE direkt während der Schwangerschaft. Das B10.PL-Weibchen hatte den Beginn 3 Tage später als das TCR.Tg4 Weibchen am Tag 9 nach Induktion also Tag 13 der Schwangerschaft und mußte am Tag 11 nach Induktion getötet werden. Das TCR.Tg4 Weibchen hatte sehr früh nach Induktion den hohen EAE-Grad von 4, erholte sich

aber völlig davon und hatte einen Wurf von 3 lebendigen und zwei toten Babies. Das Experiment zeigte, daß EAE-Induktion in der frühen Schwangerschaft in Mäusen möglich, also nicht stark supprimiert ist. Allerdings führt die EAE-Induktion in der frühen Schwangerschaft höchstwahrscheinlich zum Verlust der Schwangerschaft in den meisten Tieren. Da die Schwangerschaft gerade im ersten Drittel extrem sensitiv gegen äußere Einflüsse ist, wurden weitere Vorexperimente durchgeführt, die zeigten, daß die Behandlung mit CFA und PT in späteren Phasen der Schwangerschaft keinen negativen Einfluß auf die Schwangerschaft hatte (nicht gezeigt). Der EAE-Verlauf hat seinen Höhepunkt ca. 10-15 Tage nach Induktion in TCR.Tg4. Daher würde eine EAE-Induktion in einer späteren Phase der Schwangerschaft den Höhepunkt erst nach der Schwangerschaft haben. Da jedoch die Induktion von Toleranz in Autoimmunerkrankungen gerade im Vorfeld bzw. in der Induktionsphase der Autoimmunerkrankung am erfolgreichsten ist, sollte die Expression des Transgenes während dieser frühen EAE-Induktionsphase in der Schwangerschaft auch den EAE-Verlauf danach beeinflussen können. Daher wurde entschieden in den folgenden Schwangerschaftsexperimenten EAE 8,5 Tage post Koitus zu induzieren.

Da die Ergebnisse auf li-ko Hintergrund in vivo und bei den Milz-Proliferationsversuchen eine bessere Präsentation des Peptides zeigten, sollten die EAE-Experimente auch auf li-ko Hintergrund durchgeführt werden. Dazu wurden TCR.Tg4 Mäuse auf li-ko Hintergrund gekreuzt. Die EAE-Induktion beruht auf der Aktivierung von antigenspezifischen CD4-Zellen durch die Präsentation des Autoantigenes von MHC II auf aktivierten Dendritischen Zellen. Da die TCR.Tg4-Tiere auf li-ko Hintergrund nur ca. 1/3 des normalen MHC II exprimieren, und auch nur ca. 10% CD4-Zellen im Vergleich zu ca. 15-20% in PBL's haben (eigene Daten nicht gezeigt), mußte zuerst getestet werden, ob diese Tiere überhaupt reproduzierbar EAE bekommen.



Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>1</sup>	Mittleres Maximum <sup>2</sup>	Tot <sup>3</sup>
TCR.Tg4	3/3	10 ± 2	4,3 ± 0,6	1 (28)
TCR.Tg4 x li-ko	13/13	19 ± 10	3,3 ± 1,5	3 (23;36;27)

- 1 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven mit Standardabweichung
- 2 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung
- 3 Tote wurden aus der weiteren Wertung für die Kurven rausgenommen; Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere

**Abb. 37: EAE-Induktion in TCR.Tg4 auf li-ko-Hintergrund.** Aktive EAE-Induktion mit Peptid (Ac1-10) in CFA und Pertussistoxin. Die Kurven zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen. Alle Tiere waren H-2<sup>u</sup>.

Das Experiment in Abb. 37 zeigt, daß die TCR.Tg4 x li-ko einen stark verzögerten Verlauf haben. Der durchschnittliche Beginn bei TCR.Tg4 x li-ko liegt bei 19 Tagen mit einer Standardabweichung von 10 Tagen. Obwohl alle Tiere EAE bekamen und dies mit einem relativ hohen durchschnittlichem Maximum von 3,3, war der Zeitpunkt des Beginns und des Höhepunktes sehr variabel. Daher ist die Durchschnittskurve sehr niedrig. Der Grund für diese hohe Variabilität ist unklar. Zum einen könnte der genetische Hintergrund eine große Rolle dabei spielen, da die li-ko Mäuse auf einen C57BL/6 Hintergrund waren und die Rückkreuzung von TCR.Tg4 x li-ko auf B10.PL-Hintergrund im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar war (Es sind mindestens 7 Rückkreuzungen notwendig um einen reinen genetischen Hintergrund zu erhalten). Zum anderen könnte die geringere Antigenpräsentation eine verzögerte Aktivierung bewirken.

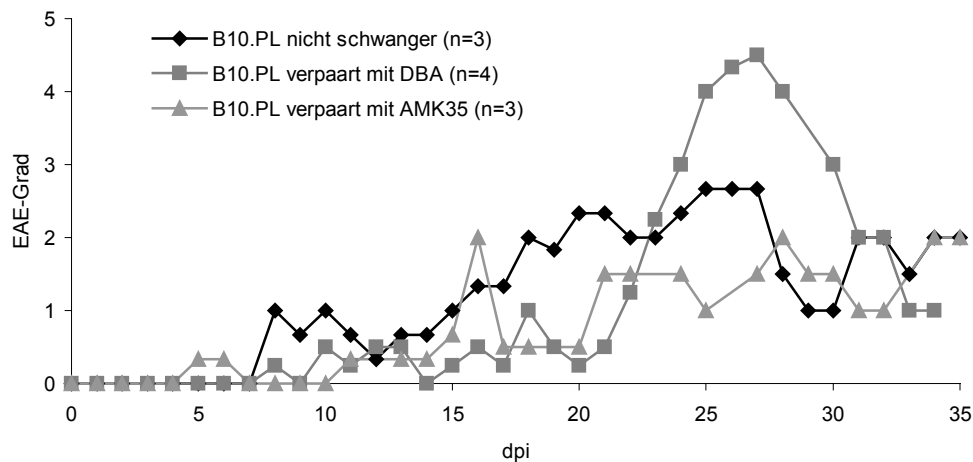
Dieser verzögerte und vor allem sehr variable EAE-Verlauf in TCR.Tg4 auf li-ko Hintergrund macht eine reproduzierbare EAE-Induktion und die Aussage, ob ein Transgen zu einer verzögerten oder abgeschwächten EAE führt, sehr schwierig. Zudem sollte in den EAE-Schwangerschaftsexperimenten der EAE-Beginn während oder kurz nach dem Ende der Schwangerschaft stattfinden. Daher waren diese Tiere zumindest auf diesem genetischen Hintergrund ungeeignet um in den Schwangerschaftsexperimenten eingesetzt zu werden.

### **5.3.3 EAE-Induktion in der Schwangerschaft mit transgenen Männchen**

Um die Hypothese zu testen, daß die Expression von Autoantigenen durch den Fötus einen inhibitorischen Einfluß auf die Autoimmunkrankheit in der Mutter hat, sollte das transgene MBP-I-A<sup>u</sup> Konstrukt in der Schwangerschaft nur von Zellen fötalen Ursprungs exprimiert werden. Daher wurden transgene Männchen der Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> mit Weibchen verpaart, in denen mit dem Autoantigen MBP Ac1-10 EAE induziert werden konnte. Mit den Männchen der verschiedenen transgenen Linien wurde eine Serie von Experimenten unternommen, in der EAE am Tag 8,5 der Schwangerschaft induziert wurde. Der Verlauf der Schwangerschaften in diesen Experimenten wurde mittels Gewichtsbestimmung verfolgt. Alle Tiere, die in den folgenden Versuchen mit verpaart bezeichnet werden, und keinen Abort hatten, hatten Würfe.

Das Experiment in Abb. 38 zeigt den EAE-Verlauf in B10.PL-Weibchen, die mit DBA/2 bzw. mit AMK<sub>35</sub> Männchen verpaart wurden. DBA/2-Männchen wurden als Kontrolle verwendet, da die AMK<sub>35</sub>-Männchen F1-Rückkreuzungen des Founders mit DBA/2-Tieren waren. Der durchschnittliche EAE-Beginn ist in beiden Gruppen im Vergleich zu nicht Schwangeren verzögert von ca. 10 auf 15-16 Tage, das heißt, daß die meisten Schwangeren EAE erst nach der Geburt bekamen. In beiden Schwangeren-Gruppen ist kein wesentlicher Unterschied des Beginns der EAE-Induktion zu erkennen. Die durchschnittliche Stärke bei Schwangeren von AMK<sub>35</sub> ist nur 3 im Vergleich zu 4,8 bei Schwangeren von DBA/2. Insbesondere zeigt die EAE-Verlaufskurve zu dem späten Zeitpunkt von 25 Tagen nach Induktion deutlich höhere EAE-Werte in den mit DBA/2 verpaarten Weibchen, welche zum Tod von dreien dieser Tiere führte. Dieser Unterschied ist erst relativ spät nach dem Ende der Schwangerschaft zu sehen. Die Gruppe der nicht Schwangeren hatte jedoch nicht deutlich stärker EAE als die mit AMK<sub>35</sub> verpaarten. Dies und die späteren Experimente weisen eher

auf einen negativen Einfluß der Verpaarung mit DBA/2-Männchen hin als auf einen inhibitorischen Einfluß der AMK<sub>35</sub> Männchen.



Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>2</sup>	Mittleres Maximum <sup>3</sup>	Tot <sup>4</sup>	Aborte <sup>5</sup>
a) Nicht schwanger <sup>1</sup>	3/3	10 ± 4	3,7 ± 1,2	1 (27)	-
b) Verpaart mit DBA/2	4/4	16 ± 5	4,8 ± 0,5	3 (26;27;23)	0
c) Verpaart mit AMK <sub>35</sub>	3/3	15 ± 5	3,0 ± 2,0	1 (16)	0

1 verpaart, jedoch nicht schwanger

2 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven mit Standardabweichung

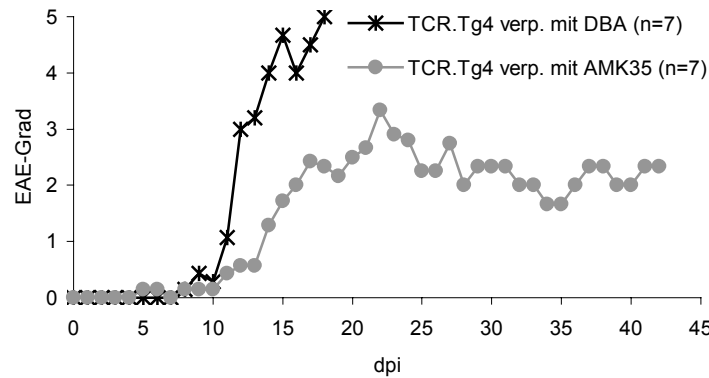
3 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung

4 Tote wurden aus der weiteren Wertung für die Kurven rausgenommen; Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere

5 spontane Aborte, d.h. plötzlicher Gewichtsverlust mindestens 3 Tage vor Geburtstermin und kein Wurf.

**Abb. 38: EAE-Induktion in B10.PL Weibchen verpaart mit AMK<sub>35</sub>.** B10.PL Weibchen wurden für 2 Tage mit DBA/2 bzw. AMK<sub>35</sub>- Männchen verpaart und dann getrennt (Tag 0,5). Die Schwangerschaft wurde durch Gewichtszunahme bestimmt. Am Tag 8,5 der Schwangerschaft wurde EAE induziert mit Peptid (Ac1-10) in CFA. Pertussistoxin wurde am Tag 9,5 und 11,5 gegeben. Die Würfe erfolgten zwischen Tag 9 und 12 nach EAE-Induktion (dpi). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen. Die AMK<sub>35</sub>-Männchen waren (28035 x DBA)<sub>F1</sub> und waren H-2<sup>bd</sup> bzw. H-2<sup>d</sup>.

EAE ist in TCR.Tg4 schneller induzierbar, und die Daten der EAE-Induktion in AMY<sub>04</sub> Tieren zeigten, daß Toleranz in dem TCR.Tg4 T-Zell Repertoire leichter zu induzieren ist, als in einem wt-Repertoire. Daher wurden Verpaarungen von TCR.Tg4 Weibchen mit den Männchen der verschiedenen transgenen Linien durchgeführt. Das Experiment in Abb. 39 zeigt den EAE-Verlauf in TCR.Tg4 Weibchen schwanger von DBA/2 bzw. AMK<sub>35</sub>. Die Verlaufskurve zeigt, daß die mit DBA/2 verpaarten alle ziemlich einheitlich um Tag 15 nach Induktion starben oder getötet werden mußten. In der Gruppe die mit AMK<sub>35</sub> verpaart wurde, starben auch 4 von 7 Tieren, jedoch zu späteren Zeitpunkten zwischen Tag 17 und Tag 27. Im Vergleich zu den mit DBA/2 verpaarten ist der EAE-Verlauf verzögert und schwächer in der Gruppe, die mit AMK<sub>35</sub> verpaart wurde. Der stärkere EAE-Verlauf und die höhere Anzahl toter Tiere in der DBA/2-Gruppe korreliert mit den Daten der B10.PL Weibchen. Ein Vergleich mit den Daten aus Abb. 40, in der anstelle von DBA/2-Männchen transgen-negative Geschwistertiere benutzt wurden, zeigt jedoch, daß der schlechtere EAE-Verlauf in Verpaarungen mit DBA/2 eher auf Unterschieden des genetischen Hintergrundes der Männchen als auf der Expression des Transgenes beruht.



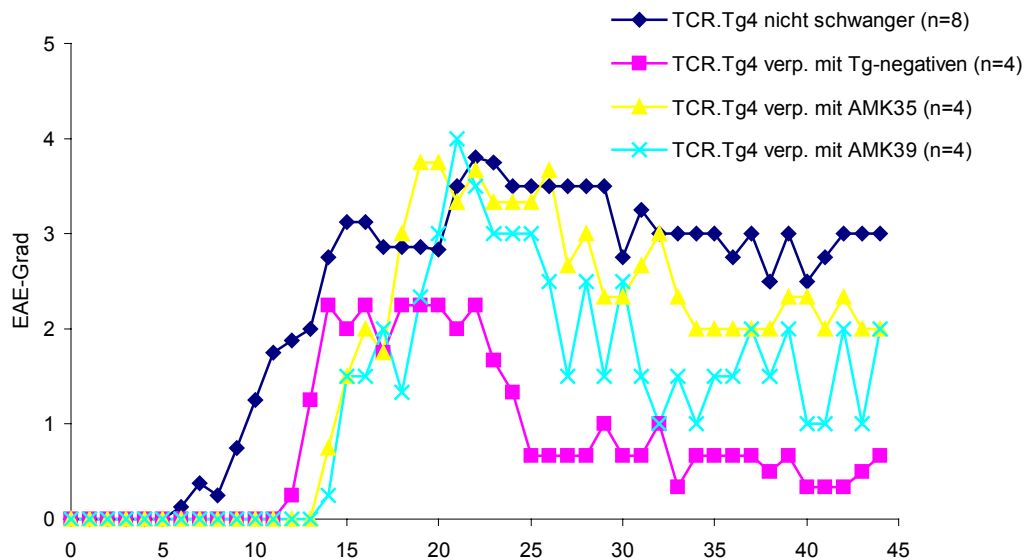
Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>1</sup>	Mittleres Maximum <sup>2</sup>	Tot <sup>3</sup>	Aborte <sup>4</sup>
Verpaart mit DBA/2	7/7	11 ± 2	4,4 ± 1,0	7 (15;14;15; 12*;12*;18;14)	0
Verpaart mit AMK <sub>35</sub>	7/7	13 ± 5	4,1 ± 1,5	4 (24;17;22;27)	1

- 1 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven mit Standardabweichung  
 2 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung  
 3 Tote wurden aus der weiteren Wertung für die Kurven rausgenommen; Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere  
 4 spontane Aborte, d.h. plötzlicher Gewichtsverlust mindestens 3 Tage vor Geburtstermin und kein Wurf.  
 \* getötet mit EAE 3 wegen sehr schlechter Verfassung

**Abb. 39: EAE-Induktion in TCR.Tg4 Weibchen verpaart mit AMK<sub>35</sub>.** TCR.Tg4 Weibchen wurden für 2 Tage mit DBA/2 bzw. AMK<sub>35</sub>- Männchen verpaart und dann getrennt (Tag 0,5). Die Schwangerschaft wurde durch Gewichtszunahme bestimmt. Am Tag 8,5 der Schwangerschaft wurde EAE induziert mit Peptid (Ac1-10) in CFA. Pertussistoxin wurde am Tag 9,5 und 11,5 gegeben. Die Würfe erfolgten zwischen Tag 9 und 12 nach EAE-Induktion (dpi). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen. Die AMK<sub>35</sub>-Männchen waren (28035 x DBA)<sub>F1</sub> und waren H-2<sup>bd</sup> bzw. H-2<sup>d</sup>.

Das Experiment in Abb. 40 zeigt die EAE Induktion in Verpaarungen mit transgen-negativen Männchen im Vergleich zu transgen-positiven der Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub>. Parallel dazu ist der Verlauf in nicht Schwangeren gezeigt. Als erstes wird die Verzögerung des EAE-Verlaufes bei allen Schwangeren-Gruppen im Vergleich zu nicht Schwangeren deutlich. Der durchschnittliche Beginn ist bei Tieren, die mit transgen-negativen Männchen verpaart wurden um ca. 5 Tage verzögert. Beide Gruppen, die mit transgenen Männchen verpaart wurden, haben im Vergleich zu Verpaarungen mit nichttransgenen einen verzögerten Beginn von ca. 2 Tagen. Dies ist jedoch auf die zwei Aborte in der Gruppe der Verpaarungen mit nichttransgenen Männchen zurückzuführen, da die Weibchen mit Schwangerschaftsverlust früher EAE bekamen. Ansonsten ist sowohl der EAE-Verlauf, als auch das mittlere Maximum in den mit AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> verpaarten Weibchen eher höher als in der Gruppe, die mit transgen negativen Männchen verpaart wurde. Dieses Experiment zeigt, daß die Transgene in AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> zumindest bei diesem experimentellen Aufbau keinen positiven Einfluß auf den EAE-Verlauf nach Induktion in der Schwangerschaft haben.

Da die Linie AMY<sub>04</sub> kein vollständiges Peptid-MHC-Konstrukt, sondern nur ein Peptid exprimiert, könnte gerade dieses hochaffine Peptid vom Fötus oder der Plazenta in den mütterlichen Kreislauf gelangen und in den Lymphknoten der Mutter Toleranz gegenüber diesem Antigen erzeugen. Aus diesem Grund wurde auch mit Männchen dieser Linie ein Schwangerschafts-Versuch mit EAE-Induktion durchgeführt (Abb. 41).

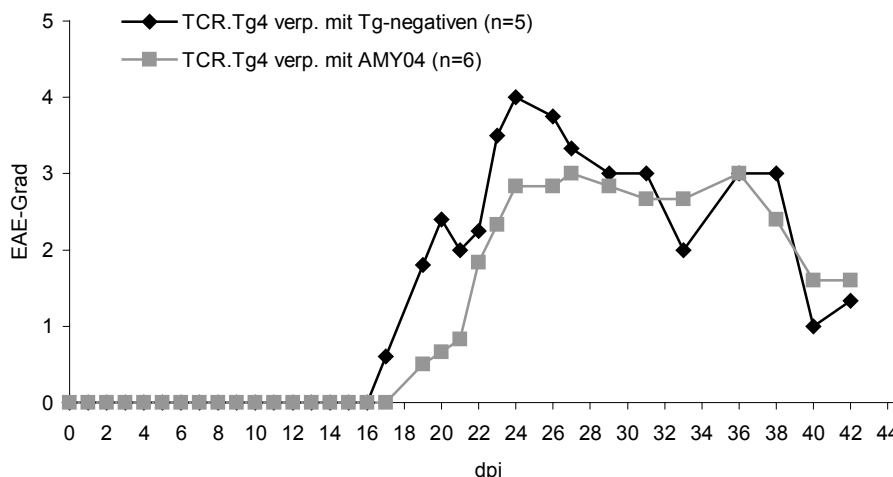


Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>2</sup> dpi	Mittleres Maximum <sup>3</sup>	Tot <sup>4</sup>	Aborte <sup>5</sup>
Nicht schwanger <sup>1</sup>	8/8	9 ± 2	4,4 ± 0,5	3 (21;16;22)	-
Verpaart mit transgen negativen	4/4	14 ± 3 (P<0,03) <sup>6</sup>	3,5 ± 1,3	1 (22)	2
Verpaart mit AMK <sub>35</sub>	4/4	16 ± 2	4,3 ± 0,5	1 (20)	0
Verpaart mit AMK <sub>39</sub>	4/4	16 ± 2	4,3 ± 1,0	2 (21;17)	0

- 1 verpaart, jedoch nicht schwanger
- 2 durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven mit Standardabweichung
- 3 durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung
- 4 Tote wurden aus der weiteren Wertung für die Kurven rausgenommen; Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere
- 5 spontane Aborte, d.h. plötzlicher Gewichtsverlust mindestens 3 Tage vor Geburtstermin und kein Wurf.
- 6 Vergleich zur nicht Schwangeren Kontrollgruppe mit t-Test.

**Abb. 40: EAE-Induktion in TCR.Tg4 Weibchen verpaart mit AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub>.** TCR.Tg4 Weibchen wurden für 2 Tage mit AMK<sub>35</sub>- bzw. AMK<sub>39</sub>- Männchen oder transgen negativen Geschwistertieren verpaart und dann getrennt (Tag 0,5). Die Schwangerschaft wurde durch Gewichtszunahme bestimmt. Am Tag 8,5 der Schwangerschaft wurde EAE induziert mit Peptid (Ac1-10) in CFA. Pertussistoxin wurde am Tag 9,5 und 11,5 gegeben. Die Würfe erfolgten zwischen Tag 9 und 12 nach EAE-Induktion (dpi). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen.

In Verpaarungen mit AMY<sub>04</sub> ist der EAE-Verlauf trotz gleichem durchschnittlichem Beginn leicht verzögert. Das durchschnittliche Maximum ist in Verpaarungen mit AMY<sub>04</sub> mit 3,5, im Vergleich zu 4,4 in Verpaarungen mit Transgen negativen Männchen leicht abgeschwächt ( $p < 0,03$ ).



Gruppe	Inzidenz	Beginn <sup>1</sup>	Mittleres Maximum <sup>2</sup>	Tot <sup>3</sup>	Aborte <sup>4</sup>
Verpaart mit transgen negativen	5/5	20 ± 2	4,4 ± 0,5	2 (26;20)	0
Verpaart mit AMY <sub>04</sub>	6/6	20 ± 1	3,5 ± 0,5 (P<0,03) <sup>5</sup>	1 (33)	0
1	durchschnittlicher Beginn von progressiver EAE bei EAE positiven mit Standardabweichung				
2	durchschnittliches Maximum der ganzen Gruppe mit Standardabweichung				
3	Tote wurden aus der weiteren Wertung für die Kurven rausgenommen; Zahlen in Klammern: Todestag einzelner Tiere				
4	spontane Aborte, d.h. plötzlicher Gewichtsverlust mindestens 3 Tage vor Geburtstermin und kein Wurf.				
5	Im Vergleich zur obigen Kontrollgruppe mit t-Test.				

**Abb. 41: EAE-Induktion in TCR.Tg4 Weibchen verpaart mit AMY<sub>04</sub>.** TCR.Tg4 Weibchen wurden für 2 Tage mit AMY<sub>04</sub> - Männchen oder transgen negativen Geschwistertieren verpaart und dann getrennt (Tag 0,5). Die Schwangerschaft wurde durch Gewichtszunahme bestimmt. Am Tag 8,5 der Schwangerschaft wurde EAE induziert mit Peptid (Ac1-10) in CFA. Pertussistoxin wurde am Tag 9,5 und 11,5 gegeben. Die Würfe erfolgten zwischen Tag 9 und 12 nach EAE-Induktion (dpi). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Die Tabelle zeigt statistische Daten zu den einzelnen Gruppen.

*Die Schwangerschaftsexperimente zeigen, daß die Expression der Transgene im Fötus und der Plazenta von AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> keinen maßgeblichen Einfluß auf den Verlauf von EAE in der Mutter nach aktiver Induktion am Tag 8,5 der Schwangerschaft ausübt. Die mit der Linie AMY<sub>04</sub> verpaarten Weibchen haben einen leicht verzögerten und abgeschwächten EAE-Verlauf. Die Schwangerschaft selbst übt einen inhibitorischen Einfluß auf den Beginn von EAE aus. Die Verpaarung mit DBA/2-Männchen scheint entweder diesen inhibitorischen Einfluß nicht auszuüben, oder hat einen dominant-negativen Einfluß auf den EAE-Verlauf.*

## **6. Diskussion**

### **6.1 Strategie**

In der vorliegenden Arbeit sollte ein transgenes Maussystem aufgebaut und eingesetzt werden um die Hypothese zu testen, ob ein fötal exprimiertes Autoantigen die Induktion von Autoimmunität in der Mutter beeinflussen kann. Die Hypothese beruht auf Daten mit einem transgenen TCR-Maussystem, in dem gezeigt wurde, daß die Expression paternaler Antigene in der Schwangerschaft zu einer transienten Toleranz gegenüber diesen Antigenen führt (Tafari et al., 1995). Diese transiente Toleranz ähnelt der transienten Remission von T-Zell basierten Autoimmunkrankheiten während der Schwangerschaft beim Menschen und in Mausmodellen.

In der Literatur wurden verschiedene Antigen-unspezifische Faktoren der Schwangerschaft beschrieben, die einen inhibitorischen Effekt auf T-Zell basierte Autoimmunmodelle wie EAE oder die Kollagen induzierte Arthritis (CIA) haben (Wilder, 1998). Solche Faktoren könnten in der Schwangerschaft alleine oder auch in Kooperation mit der tolerogenen Expression von Autoantigenen im Fötus zur Remission beitragen.

Das oben erwähnte TCR-transgene System war ein MHC Klasse I (MHC I) abhängiges System, in dem TCR-transgene CD8 Zellen antigenspezifisch tolerisiert werden. Die meisten Autoimmunkrankheiten sind jedoch von CD4-Zellen vermittelt, denen das Autoantigen von MHC Klasse II-Molekülen (MHC II) präsentiert wird. Im Gegensatz zu MHC I wird MHC II jedoch nur von sehr wenigen Zellen in der Plazenta exprimiert. Im Menschen wurden jedoch trotz dieser restringierten Expression anti-paternale Antikörper gegen MHC II aus der Plazenta extrahiert. Diese Antikörper hatten einen inhibitorischen Einfluß auf die Rheumatoide Arthritis (Moynier et al., 1987). Dies zeigt, daß im Menschen MHC II sehr wohl vom maternalen Immunsystem erkannt wird, und daß dies auch einen tolerogenen Einfluß haben kann. In einem transgenen BCR-System wurde gezeigt, daß B-Zellen, die einen BCR, gegen ein paternales MHC I Molekül exprimieren, während einer Schwangerschaft mit Föten, die dieses MHC I exprimieren, bereits im Knochenmark der Mutter deletiert werden (Ait-Azzouzene et al., 1998). Dies zeigt, daß fötale Zellen, in der Zirkulation der Mutter, wahrscheinlich zur Bildung von Toleranz gegenüber paternalen Antigenen beitragen können.

Das Maus-Modell EAE wurde als Autoimmunkrankheit ausgewählt. Dies geschah vor allem daher, daß diese Krankheit sehr schnell und einfach, mit definierten Epitopen zu induzieren ist. Zudem gibt es mehrere TCR-transgene Mauslinien, die ein spezifisches Epitop von MBP erkennen. In einem solchen homogenen TCR-transgenem Repertoire sollten phänotypische Veränderungen der T-Zellen als Reaktion auf die Transgenexpression leichter zu beobachten sein, als in einem normalen heterogenen T-Zellrepertoire. Zudem kann unter Umständen die Toleranzbildung eher in einem homogenen T-Zellrepertoire beobachtet werden, als in einem wt-Repertoire, in dem T-Zellen mit verschiedenster Affinität für das Autoantigen gebildet werden. Da EAE bereits erfolgreich in schwangeren Mäusen (versehentlich) induziert worden war (David Wraith, persönliche Mitteilung), wußten wir, daß in diesem Modell in Mäusen die Krankheit durch die Schwangerschaft nicht absolut unterdrückt wird. Um die ex-



perimentelle Variation so gering wie möglich zu halten, wurde die TCR-transgene Mauslinie, TCR.Tg4, von David Wraith ausgewählt, da diese keine spontane EAE entwickelt (Liu et al., 1995).

Das autoantigene MBP-Epitop in den TCR.Tg4 Mäusen und in B10.PL Tieren ist das acetylierte Peptid Ac1-10. Zur Expression des Autoantigens wurde ein Fusionskonstrukt gewählt, in dem das autoantigene Epitop direkt kovalent an das MHC II Molekül gebunden ist. Andere Möglichkeiten wären die Expression eines Minigens, indem nur das Peptid über eine Signalsequenz als sekretorisches, lösliches Antigen exprimiert wird (Vowles et al., 2000), oder der Austausch von CLIP in der invarianten Kette mit dem Autoantigenen Epitop (Carstens et al., 2000). Die wt-Sequenz Ac1-10 hat eine sehr niedrige Affinität zu I-A<sup>u</sup>. Daher sollte die kovalente Bindung an das MHC II Molekül eine deutlich bessere Präsentation ermöglichen. Durch die Bindung an das MHC II-Molekül kann ein Peptid, das aus der MHC-Bindungsgrube herausgefallen ist, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit erneut in diese binden, als ein nicht kovalent gebundenes Peptid. Die von anderen Gruppen produzierten Peptid-MHC-Konstrukte zeigten, insbesondere auf dem Invariante Kette knockout (li-ko)-Hintergrund, eine sehr effiziente Präsentation. Praktisch 100% der transgenen MHC II Moleküle waren mit den kovalent gebundenen Peptiden besetzt (Ignatowicz et al., 1996a). Da das wt-Epitop Ac1-10 eine so niedrige Affinität zum MHC-Molekül hat, könnte eine Verdrängung durch andere, höheraffinere Peptide trotz der kovalenten Kopplung die Präsentation stark beeinträchtigen. Daher wurde auch ein zweites Konstrukt hergestellt, in dem ein analoges Peptid Ac1-10 (4Y) mit höherer Affinität kovalent an das MHC II gebunden sein sollte.

Der Mechanismus und der Ort der Toleranzinduktion in den oben geschilderten Systemen in der Schwangerschaft ist nicht bekannt. Wir gingen deshalb von der Annahme aus, daß die Toleranz gegenüber paternalen Antigenen durch fötale Zellen vermittelt wird, die das Antigen maternalen T-Zellen präsentieren. Daher wurde für die Expression der Transgene ein MHC Klasse II-Promotor verwendet. Dadurch sollte das autoantigene Epitop in seinem natürlichen Kontext exprimiert bzw. präsentiert werden.

Um eine möglichst starke Antigendichte zu erhalten, sollten die transgenen Linien auch auf den li-ko Hintergrund gekreuzt werden.

## 6.2 Founder-Linien

Es wurden zwei unterschiedliche MHC II  $\beta$ -Ketten Konstrukte hergestellt, eines mit dem niedrigaffinen wt- und eines mit dem hochaffinen analogen Peptid. Dabei wurde anstelle der Acetylierung ein Glycin eingesetzt. In mehreren Systemen wurde bereits gezeigt, daß eine N-terminale Verlängerung die Acetylierung des MBP-Peptides ersetzen kann (Lee et al., 1998; Radu et al., 2000; Wraith et al., 1989). Ein Vorexperiment mit Peptiden, die denen in den Konstrukten glichen, zeigte, daß die Peptide durch die N-terminale erweiterte Sequenz ähnlich stark an I-A<sup>u</sup> binden und das T-Zell Hybridom 1934.4 aktivieren konnten wie die acetylierten analogen Peptide (Abb.7). Die Peptid-MHC-Konstrukte wurden nach demselben Prinzip mit einem ähnlichen Primeraufbau wie in (Fukui et al., 1997) hergestellt, indem der humane DR $\beta$ -Promotor und die dazugehörige Signalsequenz vor die cDNA-Sequenz der reifen MHC- $\beta$  Kette von I-A<sup>u</sup> kloniert wurde. Zusätzlich wurde unter demselben Promotor noch

die I-A<sup>u</sup>  $\alpha$ -cDNA kloniert, damit die Expression direkt mit I-A<sup>u</sup>-spezifischen Antikörpern, jedoch unabhängig von endogenen I-A<sup>u</sup> bestimmt werden konnte. Mit den Transgenkonstrukten wurden zwei verschiedene Arten von Founder-Linien, AMK und AMY erzeugt. Die AMK-Linien sollten das niedrigaffine Peptid MBP 1-10 (4K) und die AMY-Linien das hochaffine MBP 1-10 (4Y) im Komplex mit I-A<sup>u</sup> exprimierten.

Es wurden 8 unterschiedliche transgene Linien generiert, 4 AMK- und 4 AMY-Linien. Mit den ersten Founder-Linien war auf Proteinebene keine Expression zu sehen. Die Transgene in AMK und AMY sollten durch den MHC II-Promotor sowohl im Thymus, als auch in der Peripherie exprimiert werden. Die thymische Expression des transgenen Autoantigens sollte zur Deletion von MBP1-10-spezifischen T-Zellen im Thymus führen. Da die negative Selektion ein sehr sensibler Nachweis für Antigen ist, wurden alle transgenen Linien mit TCR.Tg4 verpaart und mit doppeltransgenen Nachkommen die thymische Deletion untersucht. Zudem wurden alle transgenen Linien mittels RT-PCR von Milz-RNA auf Expression untersucht. Später konnte mit Antikörpern die Expression des Transgenes in den selektierten AMK-Linien nachgewiesen werden. Die thymische Expression der Transgene unter dem MHC Klasse II Promotor führte je nach Expressionsstärke zu einer leichten bis sehr starken Deletion der Thymozyten in doppeltransgenen Tieren (siehe unten "Thymische Deletion"). Mittels RT-PCR (Abb. 10) und thymischer Deletion (Abb. 11 und Tabelle 2) wurden drei der Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

Die drei Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> hatten in der RT-PCR alle ein etwa gleich starkes Signal (Abb. 10). Trotzdem konnte auf Proteinebene mit einem Antikörper gegen I-A<sup>u</sup> nur bei den AMK-Linien und nicht bei AMY<sub>04</sub> Expression gefunden werden (Abb. 15). Eine später wiederholte Sequenzierung des  $\beta$ -Kettenkonstruktes der AMY-Linien zeigte eine Leserahsternmutation, die zu einem 88AS-Peptid führte, mit nur wenigen Aminosäuren von I-A<sup>u</sup>. Die Analyse der thymischen Deletion zeigen, daß auch die verschiedenen doppeltransgenen AMY-Linien trotz des fehlerhaften  $\beta$ -Ketten-Konstruktes zur negativen Selektion im Thymus führen. Dies bedeutet, daß, obwohl kein komplettes Peptid-MHC-Molekül produziert wurde, das autoantigene Peptid im Thymus generiert, von dem endogenen I-A<sup>u</sup> präsentiert und dadurch Thymozyten deletiert wurden.

Der Vergleich zwischen den in der RT-PCR gleichstarken Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> zeigt, daß das Transgen der AMY<sub>04</sub>-Linie trotz des höheraffinen Peptids zu einer schwächeren Deletion in doppeltransgenen Tieren führt. Die i.p. Injektion des hochaffinen MBP Ac1-9 (4Y) durch Liu et al. führte zu einer stärkeren thymischen Deletion in TCR.Tg4-Tieren, als die Injektion des niedrigaffinen Ac1-10 (4K) (Liu et al., 1995). Das bedeutet, daß das transgene, autoantigene Peptid in AMY<sub>04</sub>-Tieren entweder relativ instabil ist und/oder schlecht präsentiert wird oder, daß der Ansatz ein Peptid direkt an das MHC-Molekül zu koppeln zu einer wesentlich besseren Präsentation führt, als die alleinige Expression des Peptides in APC's.

Da wie bereits beschrieben der Ort und die APC der Toleranzinduktion gegen paternale Antigene in der Schwangerschaft nicht bekannt ist, wäre auch eine Tolerisierung durch lösliche fötale Antigene denkbar, die in die maternale Zirkulation gelangen und von maternalen APC's präsentiert werden. Da in den AMY-Tieren wahrscheinlich ein solches Peptid expri-

miert wird, wurde eine der Linien mit der Leserastermutation, AMY<sub>04</sub>, behalten und in einigen Versuchen verwendet.

Die Transgene in AMK und AMY werden unter der Kontrolle eines MHC II-Promotors exprimiert. Daher sollten die T-Zellen, die spezifisch für das Antigen in Kombination mit I-A<sup>u</sup> sind, entweder im Thymus deletiert, oder in der Peripherie tolerisiert werden. Falls die Toleranz nicht aufrechterhalten werden sollte, wäre eine systemische Autoimmunkrankheit zu erwarten, und eventuell eine lokale Autoimmunreaktion zum ZNS in Form von EAE. Eine spontane Form von EAE wurde in diesen Tieren nicht gefunden. Jedoch waren einige der doppeltransgenen Tiere der AMK-Linien körperlich unterentwickelt. Bei doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> gab es auch eine höhere spontane Sterblichkeitsrate in jungen Mäusen. Dies könnten Zeichen einer systemischen Autoimmunreaktion darstellen. Denkbar wäre, daß durch die Expression des Transgens viele B-Zellen unspezifisch aktiviert werden, und dies zu einem erhöhten Antikörpertiter und Ablagerung von Immunkomplexen in manchen Tieren führt. Jedoch könnte dies auch durch den Integrationsort der Transgene hervorgerufen werden.

*Die Daten der negativen Selektion im Thymus zeigen, daß die Transgene funktionell exprimiert werden, und das autoantigene Peptid selbst in niedrig exprimierenden Mauslinien noch zur negativen Selektion von TCR.Tg4-Thymozyten führt. Dies zeigt, daß selbst ein Peptid mit niedriger Affinität durch die kovalente Bindung an das MHC-Molekül effizient präsentiert wird. Durch eine Leserastermutation wird in den AMY-Linien nur das autoantigene Epitop ohne die transgene I-A<sup>u</sup>β-Kette exprimiert. Von den acht erzeugten transgenen Linien wurden die drei Linien mit der stärksten Expression, AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub>, für die weiteren Experimente ausgewählt.*

### **6.3 Expression, Gewebeverteilung und Einfluß der Invarianten Kette**

Die drei ausgesuchten transgenen Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> wurden im Detail auf Expression und die funktionelle Auswirkung der Expression auf das T-Zellrepertoire untersucht. Es war wichtig die Spezifität der Expression zu zeigen, da Transgenkonstrukte, die auf cDNA basieren, oft ektopisch exprimiert werden (Kouskoff et al., 1993).

Die RT-PCR mit Primern, die cDNA von sowohl ungespleißter, als auch gespleißter mRNA amplifizieren können, zeigte, daß die β-Kette in allen drei transgenen Linien erwartungsgemäß prozessiert wurde. Von der Linie AMK<sub>35</sub> wurden verschiedene Organe mittels RT-PCR auf Expression untersucht. Bis auf Gehirn wurde die transgene β-Kette normal wie die endogene I-Aβ-Kette exprimiert. Das heißt, daß der humane DRβ-Promotor mit Ausnahme des Gehirns zu einer normalen, MHC II-spezifischen, nicht ektopischen Expression führte. Eine lokale Entzündung im Gehirn, die zur Hochregulation von MHC II führt, lag wahrscheinlich nicht vor, da die endogene I-Aβ-Kette kaum exprimiert war. Der Promotor selbst zeigte, zumindest in anderen transgenen Linien, auch im Gehirn keine ektopische Expression (Yamamoto et al., 1994). Möglicherweise ist die Expression im Gehirn eine Eigenschaft

dieser transgenen Linien, die mit dem Integrationsort des Transgens im Genom zusammenhängt.

Auch die Transgenexpression auf Proteinebene für Knochenmark und B-Zellen aus Milz und Lymphknoten (Abb. 14 und 15) zeigt eine normale, entwicklungsspezifische Expression der Transgene in AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub>. Die Expression des Transgenes von AMY<sub>04</sub> auf Proteinebene konnte durch das Fehlen der I-A<sup>u</sup>-Kette in dem Konstrukt nicht untersucht werden.

Die Expression in AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> ist jedoch deutlich niedriger als die von endogenem I-A<sup>u</sup> in B10.PL-Mäusen. Auf B-Zellen war die Transgenexpression in AMK<sub>35</sub>-Tieren etwa 1/18 so stark wie die Expression von I-A<sup>u</sup> in B10.PL. Für die Aktivierung von T-Zellen reichen ca. 100 spezifische Peptid-MHC-Komplexe auf einer APC. Von Ferber et al. wurde gezeigt, daß schon extrem niedrige Mengen an Antigen periphere Toleranz induzieren können (Ferber et al., 1994). Wenn eine APC ungefähr 100000 MHC-Moleküle exprimiert, und auch nur 1/3 der ca. 6000 transgenen MHC-Moleküle (100000/18) auf einer B-Zelle mit dem kovalent gebundenen Peptid besetzt wären, so wären in AMK<sub>35</sub> noch etwa 2000 spezifische MHC-Peptid Komplexe auf einer APC für die Toleranzbildung zur Verfügung. Daher sollte auch diese relativ niedrige Expression zur Induktion peripherer Toleranz ausreichen.

Die Analyse von Dendritischen Zellen, generiert aus Knochenmark (BM-DC's) aus AMK<sub>35</sub>-Mäusen zeigte, daß auch Dendritische Zellen das Transgen exprimieren und nach Stimulation durch LPS hochregulieren (Abb. 16). Mit den Dendritischen Zellen von AMK<sub>35</sub>-Tieren wurde der Einfluß der Invarianten Kette (Ii) auf die Transgenexpression untersucht. AMK<sub>35</sub> B-Zellen von Ii-ko Tieren zeigten mit Antikörper gegen I-A<sup>u</sup> praktisch keine Färbung (nicht gezeigt). Auf BM-DC's war die Oberflächenexpression der Transgene in AMK<sub>35</sub> x Ii-ko im Vergleich zu AMK<sub>35</sub> x Ii-wt auf ca. 1/4 reduziert. Das ist dieselbe relative Reduktion wie bei endogener I-A<sup>b</sup> in BM-DC's von Ii-ko-Tieren (eigene Daten mit KH74-Antikörper, nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß Ii wichtig für den Transport des transgenen MHC-Moleküls zur Zelloberfläche ist, trotz des daran gebundenen MBP-Peptides. In einem anderen Peptid-MHC-Konstrukt (I-A<sup>b</sup>-Eα) (Ignatowicz et al., 1996a) wurde eine etwas geringere Reduktion durch den Ii-ko Hintergrund auf ca. 1/2 in B-Zellen und ca. 1/3 in Thymus-Epithelzellen gefunden. Auf Ii-wt Hintergrund war jedoch ein großer Teil davon nicht mit dem kovalent gebundenen Peptid besetzt, so daß APC's auf Ii-ko Hintergrund trotz der niedrigeren Oberflächenexpression besser ein dafür spezifisches Hybridom aktivieren konnten.

*Die Transgene in AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> werden durch den verwendeten MHC Klasse II-Promotor gewebespezifisch von MHC II-positiven Zellen exprimiert und nach LPS-Stimulation hochreguliert. Dies zeigt, daß sich die Transgene bezüglich der Expression wie endogenes MHC Klasse II verhalten und nicht ektopisch exprimiert werden. Die Expression ist stark genug um eine Aktivierung von T-Zellen bzw. die Toleranzinduktion in der Peripherie erwarten zu können.*

## 6.4 Auswirkungen der Transgenexpression auf das T-Zell-repertoire

### Thymische Deletion

Sowohl zur Auswahl der Founder Linien, als auch zur weiteren Charakterisierung der selektierten Linien wurde die thymische Deletion in doppeltransgenen Tieren untersucht.

Die in der RT-PCR und mit Antikörpern gegen I-A<sup>u</sup> gefundene Expression (Abb. 10 und 15) korrelierte mit dem Grad der negativen Selektion von TCR.Tg4-Thymozyten in doppeltransgenen Tieren: Im Vergleich zu  $86 \times 10^6$  Thymozyten in TCR.Tg4 war in TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> die Thymozytengesamtzahl auf bis zu  $0,8 \times 10^6$ , in TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> auf bis zu  $1,2 \times 10^6$  und in AMY<sub>04</sub> auf bis zu  $6 \times 10^6$  reduziert (Tabelle 2). In den Linien mit einem schwächeren RT-PCR Signal, wie z.B. AMK<sub>12</sub>, waren die Thymozyten nur auf  $14 \times 10^6$  reduziert. Obwohl bei den Linien AMY<sub>25</sub> und AMY<sub>40</sub> fast kein RT-PCR Signal mehr zu sehen ist, ist die Thymozytengesamtzahl trotzdem auf bis zu  $49 \times 10^6$  bzw.  $10 \times 10^6$  reduziert. Dies zeigt die extrem hohe Sensitivität der thymischen Deletion.

Je stärker die Antigene exprimiert werden, desto früher werden die Thymozyten in ihrer Entwicklung deletiert (Abb. 11). In TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> gibt es praktisch keine doppelpositiven (DP)-Zellen mehr. Hier werden die Zellen wahrscheinlich direkt beim Übergang zum DP Stadium deletiert. In TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub>, welche die Transgene nur 1/4 so stark wie AMK<sub>35</sub> exprimieren (Abb. 15), gibt es immerhin noch 10% DP, während es in TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub> 65% DP gibt. In TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> erfolgt daher die Deletion wahrscheinlich im DP-Stadium und in TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub> beim Übergang vom DP- zum einzelpositiven (SP)-Stadium, da es hier nur 4% SP im Vergleich zu 19% in TCR.Tg4 gibt.

Auch in anderen TCR-transgenen Systemen wurde Deletion in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gefunden. T-Zellen, die spezifisch für ein LCMV-Peptid, gebunden an D<sup>b</sup>, sind, werden in Tieren, die dieses Peptid im Thymus exprimieren, bereits im DP-Stadium deletiert, während sie in Tieren, die das Superantigen Mls exprimieren, erst beim Übergang zum Einzelpositiven Stadium deletiert werden (Pircher et al., 1989). Daß der unterschiedliche Entwicklungszeitpunkt, in dem die Thymozyten negativ selektioniert werden, nicht vom Antigen selbst, sondern von der Expressionsstärke abhängt, zeigt die Analyse der Thymozyten-subpopulationen von TCR.Tg4 x AMK<sub>12</sub>, in denen beim selben Antigen wie in AMK<sub>35</sub> der Großteil der Deletion erst im späten DP-Stadium stattfindet. Die differenzielle Deletion ist damit erklärbar, daß im Übergang vom DP-Stadium zum SP-Stadium der TCR ca. 10fach hochreguliert wird. Dadurch steigt die Avidität und bereits niedrig exprimierte Antigene können zur Deletion führen. Die sehr frühe Deletion im Übergang zum DP-Stadium in TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren ist mit der Expression der transgenen TCR-Ketten zu erklären, die schon in sehr frühen Stadien unter dem CD2-Promotor exprimiert werden. In dem Moment, in dem auch der CD4-Korezeptor exprimiert wird, kommt es in den Linien mit hoher Antigenexpression zur Deletion. Auffällig ist, daß es trotz der unterschiedlichen Expressionsstärke und des unterschiedlichen Zeitpunkts der negativen Selektion in doppeltransgenen Tieren der Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> fast keine Zellen gibt, die die transgene TCR-β-Kette V8.2 und CD4 hoch exprimieren (Abb. 11d). Daß heißt, daß unabhängig von dem Zeitpunkt der nega-

tiven Selektion, der Zustand von hoher TCR-Expression zusammen mit der Expression von CD4 vermieden wird.

In doppeltransgenen Tieren der Linie AMK<sub>35</sub> wurde die negative Selektion im Thymus im Detail untersucht (Abb. 17). In TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren ist der größte Teil der Thymozyten im doppelnegativen (DN)-Stadium, und viele davon exprimieren den transgenen TCR relativ hoch (Abb. 17c). Auch von den DN-Zellen der TCR.Tg4-Thymozyten exprimieren einige Zellen den transgenen TCR hoch. Da in beiden Dotblots dieselbe Gesamtzellzahl gemessen wurde, und die Gesamtzahl der Thymozyten in doppeltransgenen Mäusen auf ca. 1/30 reduziert ist, reflektiert die relativ stärkere Population der DN in doppeltransgenen Tieren wahrscheinlich das Fehlen der DP-Zellen und keine spezifische Retention in diesem Stadium. Auffällig ist jedoch, daß trotz des Fehlens einer DP-Population in doppeltransgenen Tieren eine Population von CD4-SP und eine kleine Population von CD8-SP besteht. Jedoch zeigen fast alle diese Zellen eine niedrige Expression der transgenen TCR $\beta$ -Kette, was normalerweise fast nur bei DP-Thymozyten gefunden wird. Mehrere Erklärungsmöglichkeiten sind dafür denkbar: Es wurde gezeigt, daß Thymozyten in der Entwicklung zum DP-Stadium erst CD8 (Nikolic-Zugic und Bevan, 1988) oder CD4 (Matsumoto et al., 1991) exprimieren, also kurz durch ein SP-Stadium gehen. Die SP-Zellen in doppeltransgenen Tieren könnten daher solche Zellen darstellen, die auf dem Weg zum DP-Stadium sind und dann deletiert werden. Durch das Fehlen der DP-Zellen könnten diese Zellen hier überproportional dargestellt werden. Dafür spricht auch eine kleine Population in den CD4-SP in TCR.Tg4-Thymozyten mit niedriger TCR $\beta$ -Expression. Eine andere Möglichkeit ist, daß einige Zellen durch die niedrige TCR-Expression im DP-Stadium nicht deletiert wurden, dadurch bis zum SP-Stadium gekommen sind und in diesem Stadium selektiv akkumulierten. Für den Aufbau des Thymus ist die Wechselwirkung zwischen Thymozyten mit Thymusstromazellen wichtig (Naquet et al., 1999; Penit et al., 1996). Daher ist eine weitere Möglichkeit, daß durch die starke negative Selektion keine normale Thymusarchitektur mehr aufgebaut wird und es dadurch zu einer gestörten Thymozytenreifung kommt.

*Die thymische Expression der transgenen Peptid-MHC-Konstrukte durch den MHC II-Promotor hat sowohl in AMK-, als auch in AMY-Tieren einen starken Einfluß auf die Entwicklung von Thymozyten, die spezifisch für diesen Peptid-MHC Komplex sind. In doppeltransgenen TCR.Tg4-Tieren wird ein Großteil der Thymozyten deletiert. Dabei korreliert die Stärke, sowie der Zeitpunkt der Deletion mit der Höhe der Expression des transgenen Peptid-MHC-Konstruktes. Die Deletion in Tieren mit fast nicht meßbarer Transgenexpression zeigte die extreme Sensitivität der negativen Selektion. Die unterschiedlichen doppeltransgenen Linien demonstrierten eindrucksvoll die Flexibilität der thymischen Deletion: Trotz unterschiedlicher Zeitpunkte der thymischen Deletion wurde in fast allen Linien entweder die Existenz von einzelpositiven CD4-Thymozyten oder von Thymozyten mit hoher transgener TCR- $\beta$ - und CD4-Expression vermieden.*

#### Expression endogener V $\alpha$ -Ketten

Die Benutzung TCR-transgener Tiere hat den Vorteil, daß sowohl phänotypische, als auch funktionelle Veränderungen der T-Zellen auf einen Stimulus hin leichter beobachtet werden

können. In doppeltransgenen Tieren existieren in der Peripherie, trotz der thymischen Expression des Transgens, noch  $CD4^+$ T-Zellen, die die transgene  $V\beta 8.2$ -Kette exprimieren. Die Expression endogener  $V\alpha$ -Ketten stellt eine Möglichkeit zum Überleben der negativen Selektion dar. Solche Zellen zeigen oft eine Suppression der Oberflächenexpression des transgenen TCR. Da weder ein Klonotyp-spezifische Antikörper noch ein Antikörper gegen die transgene  $V\alpha 4$  TCR-Kette zur Verfügung stand, konnte die Frage nicht beantwortet werden, wie viele periphere  $CD4^+$ T-Zellen in doppeltransgenen Tieren den transgenen TCR überhaupt exprimieren. Daher konnten Daten dazu nur über indirekte Methoden gewonnen werden. Hierfür wurden Thymozyten und periphere  $CD4$ -Zellen von einzel- und doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> Tieren auf die Expression der endogenen TCR  $V\alpha 2$ -Kette untersucht (Abb. 18). Es wurde gefunden, daß ca. 40% der  $CD4$ -positiven Thymozyten und beinahe 30% der peripheren  $CD4$ -positiven Zellen in doppeltransgenen Tieren die endogene  $V\alpha 2$ -Kette exprimieren. In einzeltransgenen TCR.Tg4-Mäusen wird die  $V\alpha 2$ -Kette von ca. 11% der peripheren  $CD4^+$ T-Zellen exprimiert. Die Analyse von einzeltransgenen TCR.Tg4-Mäuse durch Radu et al. mit einem rekombinanten I-A<sup>u</sup>-MPB<sub>1-11</sub>(4Y) Tetramer zeigte, daß ca. 60% der peripheren  $CD4$ -Zellen den transgenen TCR exprimieren (Radu et al., 2000). Die anderen 40% exprimieren wahrscheinlich endogene  $V\alpha$ -Ketten, die mit der transgenen  $V\beta 8.2$ -Kette paaren können. Das heißt, daß die endogene  $V\alpha 2$ -Kette in TCR.Tg4-Tieren normalerweise von etwa 1/4 solcher Zellen exprimiert wird, welche endogene  $V\alpha$ -Ketten exprimieren. Wenn auch in doppeltransgenen Tieren nur 1/4 der Zellen mit endogenen  $V\alpha$ -Ketten die  $V\alpha 2$ -Kette exprimieren, heißt das, daß praktisch alle T-Zellen in doppeltransgenen Tieren endogene  $V\alpha$ -Ketten exprimieren. Andererseits könnte der hohe Anteil von 30% auch eine präferentielle Paarung der transgenen TCR  $V\beta 8.2$ -Kette mit der endogenen  $V\alpha 2$  Kette widerspiegeln. Eine präferentielle Paarung dieser Ketten ist in der Tat speziell für MBP-reaktive T-Zell Klone aus B10.PL-Tieren gezeigt worden (Zamvil und Steinman, 1990).

Durch das Fehlen eines Antikörpers gegen  $V\alpha 4$  konnte nicht untersucht werden, ob die Zellen, die  $V\alpha 2$  exprimieren, auch die transgene  $V\alpha 4$ -Kette exprimieren. Die TCR-Transgene in TCR.Tg4-Tieren sind cDNA-Konstrukte exprimiert unter dem humanen  $CD2$ -Promotor. Es sollte daher keine genomische Deletion möglich sein, die eine Expression unterdrücken würde. Es wurde jedoch gezeigt, daß sowohl transgene  $V\beta$ -, als auch  $V\alpha$ -Ketten unter bestimmten Umständen zwar transkribiert werden, jedoch nicht als reifes Protein auf der Zelloberfläche erscheinen (Alam und Gascoigne, 1998; McMahan und Fink, 1998).

*Die Analyse der endogenen  $V\alpha$ -Ketten in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>-Tieren zeigte, daß viele der  $CD4$ -positiven Zellen, die im Thymus nicht deletiert werden, die endogene  $\alpha$ -Kette exprimieren. Wahrscheinlich trägt dies zu der beobachteten Toleranz, in vitro und in vivo, gegen Stimulation durch das Autoantigen bei.*

#### Aktivierungsmarker auf Thymozyten

Die Expression verschiedener Aktivierungs- und Differenzierungsmarker wurde auf  $CD4$ -positiven Thymozyten von doppeltransgenen Tieren der Linie AMK<sub>35</sub> untersucht (Abb. 19). Die Thymozyten von TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>-Tieren waren große Zellen und zeigten eine starke

Expression der gemessenen Aktivierungsmarker. Die Aktivierungsmarker CD25 und CD44 werden normalerweise in sehr frühen Stadien der Thymozytenentwicklung exprimiert (siehe Tabelle 4). Die Größe der Zellen und die Expression der frühen Aktivierungsmarker CD25 und CD44 in CD4-positiven Thymozyten von doppeltransgenen Tieren könnte bedeuten, daß die Zellen noch in einem unreifen Stadium sind, und daß alle reiferen Stadien deletiert sind. Da diese Zellen jedoch CD4 und den TCR exprimieren, Stadien, in denen die frühen Marker CD25 und CD44 längst nicht mehr gefunden werden, ist dies eine unwahrscheinliche Erklärung. Wahrscheinlicher ist, daß diese Zellen durch eine sehr starke Antigenstimulation diese Aktivierungsmarker exprimieren. Auch der große Anteil von CD62L-negativen, CD4-positiven Thymozyten könnte damit erklärbar sein. Zudem könnte dies auch die Ansammlung des relativ großen CD4-SP Kompartimentes in doppeltransgenen Tieren erklären, da Thymozyten erst mit der Hochregulation von CD62L den Thymus verlassen. Auch die insgesamt hohe Expression von CD69, welches normalerweise in einem späten DP-Stadium exprimiert wird, spricht dagegen, daß diese Zellen frühe, unreife Stadien darstellen. Ebenso ist die hohe Expression von CD29 ein Zeichen für Aktivierung durch Antigen. Eine erhöhte CD29 Expression wird typischerweise in aktivierten, und in Memory-CD4 T-Zellen gefunden (Kohn et al., 1991; Shimizu et al., 1990). Auch in zwei anderen TCR-transgenen Modellen wurde gezeigt, daß die Inkubation von DP- oder SP-Thymozyten in vitro nach Zugabe von Antigen zur Hochregulation der Aktivierungsmarker CD25, CD44 und CD69 führt (Curnow und Schmitt-Verhulst, 1994).

*Die nicht deletierten CD4-positiven Thymozyten von doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>-Tieren werden durch die Expression des Peptid-MHC-Konstruktes im Thymus stark aktiviert. Sie exprimieren viele Aktivierungsmarker, die auch auf peripheren T-Zellen nach Antigenstimulation gefunden werden. Dies zeigt, daß diese Zellen trotz der niedrigen V $\beta$ 8.2 Expression und der Expression endogener V $\alpha$ -Ketten im Thymus durch das Antigen stimuliert wurden.*

#### Periphere CD4-Zellen in doppeltransgenen Tieren

Die Analyse der peripheren CD4<sup>+</sup>T-Zellen zeigte, daß es in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub> trotz der starken negativen Selektion im Thymus noch periphere CD4-Zellen gibt, die die transgene TCR- $\beta$  Kette exprimieren (Abb. 20). Die Anzahl dieser Zellen ist jedoch im Vergleich zu einzeltransgenen Tieren stark reduziert. Viele periphere CD4-Zellen in doppeltransgenen Tieren haben eine reduzierte Expression der transgenen V $\beta$ 8.2 Kette. Alle Zellen mit niedriger Expression des TCR haben eine hohe CD44-Expression. Interessanterweise gibt es eine Population, die total negativ für die V $\beta$ 8.2 Kette ist, und eine mittlere Expression von CD44 zeigt. Wahrscheinlich sind dies Zellen, die durch das Transgen aktiviert wurden und dadurch den TCR komplett herunterregulierten. Dadurch wurden diese Zellen nicht weiter aktiviert und CD44 wurde wieder herunterreguliert.

Obwohl die CD4-SP Thymozyten in doppeltransgenen Mäusen nur eine sehr niedrige V $\beta$ 8.2 Expression haben, gibt es in der Peripherie dennoch viele Zellen, die diese relativ hoch exprimieren. Dasselbe Phänomen wurde auch in einem anderen TCR-transgenen System mit systemischer Antigenexpression gefunden (siehe unten (Lanoue et al., 1997)). Jedoch sind die CD4-Zellen in der Peripherie bezüglich der V $\beta$ 8.2-Expression deutlich hetero-



gener als die Thymozyten. Ungefähr die Hälfte der Zellen zeigt Zeichen von Aktivierung durch Antigen wie die Herunterregulation der transgenen TCR- $\beta$  Kette und CD44-Expression. Die Population der CD4-Zellen mit höherer V $\beta$ 8.2 und niedrigerer CD44-Expression könnte den Anteil der Zellen darstellen, der eine endogene V $\alpha$ -Kette anstelle der transgenen V $\alpha$ -Kette exprimiert, und daher nicht durch das Transgen aktiviert wird.

Periphere CD4-Zellen von doppeltransgenen Tieren sind große, aktivierte Zellen und exprimieren die Aktivierungsmarker CD25, CD44, CD69 und CD29 (Abb. 21). Dies sind Oberflächenmoleküle, die sowohl direkt nach Aktivierung durch Antigen (CD25 und CD69), als auch von Zellen mit einem Memory-Phänotyp (CD44 und CD29) exprimiert werden. In doppeltransgenen Tieren sind ca. 33% der CD4-Zellen CD25-positiv im Gegensatz zu 7% in TCR.Tg4. Dies könnte bedeuten, daß in diesen Tieren der Anteil an regulatorischen CD25<sup>+</sup>CD4-Zellen höher ist und würde mit der beobachteten Toleranz gegenüber Antigenstimulation in vitro und in vivo korrelieren. Da CD25 jedoch auch ein früher Marker von aktivierten T-Zellen ist, kann nicht entschieden werden ob diese Zellen regulatorische Zellen sind oder solche, die gerade in den Lymphknoten durch das Transgen aktiviert wurden.

Der Aktivierungsmarker CD69 wird in peripheren CD4-Zellen der einzeltransgenen TCR.Tg4-Mäuse von nur 11% der Zellen exprimiert. Im Gegensatz dazu wird CD69 von 45% der peripheren CD4-Zellen in doppeltransgenen Tieren exprimiert. CD69 wird durch Antigenstimulation sehr schnell in 30-60 Minuten hochreguliert (Ziegler et al., 1994). Ohne weitere Stimulation ist die CD69-Expression jedoch nur transient. Memory-Zellen exprimieren CD69 nur nach Restimulation mit Antigen. Dies bedeutet, daß ein Großteil der CD4<sup>+</sup>T-Zellen aus doppeltransgenen Tieren, kurz vor der Organentnahme, durch die periphere Expression des transgenen Peptid-MHC-Komplexes stimuliert wurde.

Für CD25, CD69, und für CD29 gab es die in Abb. 20 gezeigte Aufteilung von hoher Expression des Aktivierungsmarkers auf den Zellen mit niedriger V $\beta$ 8.2-Expression nicht (nicht gezeigt). Interessanterweise zeigte die CD62L-Färbung, daß CD4-Zellen von doppeltransgenen Tieren, die die transgene  $\beta$ -Kette praktisch nicht mehr exprimieren, eine hohe CD62L-Expression haben (nicht gezeigt), also eher einen naiven Phänotyp haben. Diese insgesamt differentielle Expression von Oberflächenmarkern zeigt, daß die peripheren CD4-Zellen in doppeltransgenen Mäusen aus heterogenen Populationen bestehen.

*Die Existenz dieser heterogenen, peripheren Populationen spricht dagegen, daß die Expression der Aktivierungsmarker nur ein Überbleibsel der Reifung in einem Thymus mit starker Antigenkonzentration darstellt, sondern dafür, daß die peripheren CD4 T-Zellen je nach Expression der TCR-Ketten auf die Antigenstimulation durch das transgene Peptid-MHC-Konstrukt in der Peripherie reagieren.*

#### In vitro-Toleranz

Die doppeltransgenen Tiere der drei Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> haben trotz der starken thymischen Deletion noch CD4<sup>+</sup>T-Zellen in der Peripherie. In mehreren TCR-transgenen Systemen wurde gefunden, daß die Expression des Antigens im Thymus und der Peripherie zur Anergie der T-Zellen führen kann (Lanoue et al., 1997; Schönrich et al., 1992). In doppeltransgenen Mäusen von Lanoue et al., die das Antigen Hämagglutinin (HA) unter dem

Igk-Promotor und einen transgenen TCR, der spezifisch für das MHC Klasse II Molekül I-E<sup>d</sup> und HA<sub>111-119</sub> ist, exprimierten, wurde ein Großteil der TCR-transgenen T-Zellen im Thymus deletiert. Obwohl im Thymus praktisch keine CD4-SP Thymozyten mit Expression des transgenen TCR gefunden wurden, gab es in der Peripherie noch eine normale Anzahl von CD4<sup>+</sup>T-Zellen mit dem transgenen TCR ( $\alpha$  und  $\beta$ , da Clonotyp positiv). Diese Zellen exprimierten CD69, waren CD62L<sup>tief</sup>, und waren anerg gegen Antigenstimulation in vitro. Diese Anergie war irreversibel, da auch die Zugabe von IL-2 und Antikörper gegen den transgenen TCR keine Aktivierung bewirken konnten (Lanoue et al., 1997).

Es wurden daher Milzzellen der doppeltransgenen Tiere in vitro mit Antigen stimuliert. Periphere CD4-Zellen von doppeltransgenen Tieren der Linien AMK<sub>35</sub>, AMK<sub>39</sub> und AMY<sub>04</sub> waren in vitro tolerant gegen Antigenstimulation (Abb. 22). Diese beobachtete Toleranz war unabhängig von der zahlenmäßigen Reduktion der peripheren CD4-Zellen durch thymische Deletion in doppeltransgenen Tieren (Abb. 23).

Die hier gefundene Toleranz der T-Zellen von doppeltransgenen Tieren in vitro beruht daher wahrscheinlich einerseits auf Anergie und andererseits auf der Herunterregulation des transgenen TCR. Doppeltransgene Tiere haben einen erhöhten Anteil an CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Es wurde gezeigt, daß die Existenz von regulatorischen Zellen in der Peripherie abhängig von der Antigenexpression in der Peripherie ist (Seddon und Mason, 1999a). Daher ist eine zusätzliche Möglichkeit, daß die Expression des Antigens in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>35</sub>-Tieren die Bildung regulatorischer CD25-positiver CD4<sup>+</sup>T-Zellen fördert, welche durch Zytokine wie z.B. TGF- $\beta$  die Stimulation inhibieren.

#### In vivo-Toleranz

Die Auswirkung der Transgenexpression auf die Toleranz in vivo wurde mittels EAE-Induktion untersucht. Die Experimente zeigten, daß Tiere mit einem wildtyp T-Zell Repertoire durch die Expression der verschiedenen Transgene unterschiedlich tolerant gegenüber EAE-Induktion sind (Abb. 25). Tiere der Linie AMY<sub>04</sub> mit einem wt-Repertoire, die nur ein Peptid exprimiert, sind gegenüber EAE-Induktion nicht tolerant. Die beiden anderen Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> zeigen eine abgestufte Form der Toleranz, wobei AMK<sub>35</sub> nahezu komplett und AMK<sub>39</sub> nur teilweise tolerant gegen EAE-Induktion ist. Dies korreliert mit der unterschiedlich starken Expression der Transgene und der unterschiedlich ausgeprägten negativen Selektion in den beiden Linien. Daß die transgenen Tiere oftmals nur kurze, schwache EAE-Schübe hatten, könnte ein Zeichen von Regulation durch inhibitorische T-Zellen sein.

Doppeltransgene TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> entwickelten eine späte Form von EAE mit einem um durchschnittlich 50 Tage verzögertem Ausbruch (Abb. 26). Doppeltransgene Tiere der Linie AMY<sub>04</sub> waren dagegen größtenteils tolerant gegenüber EAE-Induktion (Abb. 27). Die stärkere Toleranz der doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub> gegenüber TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> könnte damit erklärt werden, daß das hochaffine Peptid in AMY<sub>04</sub> Tieren spezifisch das homogene TCR-Repertoire durch periphere Toleranzmechanismen tolerisiert. Das Konstrukt in AMK<sub>39</sub> Tieren führt zwar zu einer stärkeren thymischen Deletion, wirkt eventuell jedoch in der Peripherie schwächer tolerisierend auf die TCR.Tg4 T-Zellen. Eine Erklärung dafür, daß doppeltransgene TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub> tolerant und einzeltransgene AMY<sub>04</sub> empfänglich gegenüber EAE-Induktion sind, könnte die thymische Deletion von autoreaktiven Zellen in dem homo-

genen TCR.Tg4-Repertoire sein. In einem heterogenen wt-Repertoire dagegen gibt es wahrscheinlich mehr autoreaktive T-Zellen mit niedrigerer Affinität, die in AMY<sub>04</sub>-Mäusen nicht deletiert werden. In den Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> hingegen werden wahrscheinlich, durch die hohe Präsentation des Peptides, auch die niedrigaffineren Zellen eines wt-Repertoires deletiert.

In einem ähnlichen, nicht TCR-transgenem Modell induzierte die Expression des Autoantigens ebenso wie in unseren AMK<sub>35</sub>-Tieren in vivo Toleranz gegen EAE-Induktion (Vowles et al., 2000). In diesem Modell wurde das Peptid MBP<sub>84-105</sub> unter einem MHC II-Promotor in Mäusen exprimiert. Obwohl T-Zellen aus immunisierten Mäusen in vitro noch antigenspezifisch proliferierten, waren die Tiere größtenteils tolerant gegenüber EAE-Induktion mit dem Peptid. Einige transgene Tiere bekamen EAE, jedoch zum selben Zeitpunkt wie die nicht-transgenen Kontrollen.

Der Grund warum in TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub>-Tieren nach längerer Zeit doch EAE ausbricht ist nicht klar. Die peripheren T-Zellen aus doppeltransgenen Mäusen, die EAE entwickelten, hatten nur eine sehr leicht erhöhte Reaktivität auf Antigen (Abb. 28). In diesen Tieren wird daher die Toleranz nicht systemisch gebrochen. Die Untersuchung kurz nach EAE-Induktion in doppeltransgenen TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> zeigte, daß die Immunisierung zur Expansion und zur Hochregulation von Aktivierungsmarkern auf peripheren CD4-Zellen führte (Abb. 29). Trotzdem hatten diese Zellen keine erhöhte Reaktivität auf Antigen in vitro (Abb. 30). Die Expansion und Aktivierung war jedoch unabhängig von dem Peptid Ac1-10. Daher mußte eine unspezifische Komponente in CFA oder PT zur Aktivierung geführt haben. Tatsächlich wurden mehrere Peptide in Mycobakterium tuberculosis charakterisiert, mit denen EAE in TCR-transgenen Mäusen (Lafaille et al., 1994) induzierbar ist (Grogan et al., 1999). Das heißt, daß eventuell kreuzreaktive Peptide zu der Stimulation der CD4-Zellen in doppeltransgenen Tieren geführt haben. Eine andere Möglichkeit ist, daß die expandierten und aktivierten CD4-Zellen durch die Expression endogener V $\alpha$ -Ketten verschiedene, nicht kreuzreaktive Peptide von M.tuberculosis erkennen. Dies würde auch eher zu den in vitro-Daten passen, in denen auch nach der Immunisierung keine antigenspezifische Proliferation gefunden werden konnte.

Da durch den fehlenden klonotyp-spezifischen Antikörper nicht bekannt ist, wie viele der peripheren CD4-Zellen in doppeltransgenen Mäusen den transgenen TCR exprimieren, könnte der stark verzögerte Ausbruch von EAE in TCR.Tg4 x AMK<sub>39</sub> auch einfach auf der zahlenmäßigen Reduktion, also der Deletion, der Antigen-reaktiven Zellen beruhen. Dies ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da EAE auch in nichttransgenen Tieren wie B10.PL induziert werden kann, in denen antigenspezifische Vorläuferzellen extrem rar sind. Eine weitere Möglichkeit ist, daß einige der anergen T-Zellen ihre Toleranz durch die EAE-Induktion verlieren, im Laufe der Zeit akkumulieren und dies zu EAE führt. Des weiteren ist es vorstellbar, daß in doppeltransgenen Tieren sehr viele regulatorische CD4-Zellen die EAE-Induktion auf lange Zeit verhindern, dann aber durch die Akkumulation reaktiver, aktivierter T-Zellen ihren regulatorischen Einfluß verlieren.

*Die Charakterisierung des T-Zellrepertoires zeigte, daß die Expression der Transgene einen maßgeblichen Einfluß auf ein wt- und ein TCR-transgenes T-Zellrepertoire ausübt. In*

*doppeltransgenen Tieren wird der größte Teil der T-Zellen deletiert. Die Zellen, die nicht deletiert werden, exprimieren zu einem großen Teil endogene TCR  $\alpha$ -Ketten und Aktivierungsmarker. Sie sind in vitro tolerant gegen Stimulation mit dem MBP-Peptid. In vivo sind die einzeltransgenen Tiere der Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> tolerant gegen EAE Induktion, während einzeltransgene AMY<sub>04</sub> Tiere nicht tolerant sind. Doppeltransgene TCR.Tg4 x AMY<sub>04</sub> sind jedoch auf lange Zeit tolerant gegen EAE Induktion. Doppeltransgene Tiere der Linie AMK<sub>39</sub> sind zwar zuerst tolerant, entwickeln jedoch nach einem längeren Zeitraum EAE.*

## 6.5 Funktionelle Expression in der Peripherie

Die Toleranzbildung in der Schwangerschaft gegenüber Autoantigenen, die vom Fötus exprimiert werden, sollte durch die Expression des Transgenes auf peripheren Zellen des Fötus bewirkt werden. Die vorigen Experimente zeigten, daß das transgene Peptid-MHC-Konstrukt im Thymus und in der Peripherie exprimiert wird und dadurch einen starken Einfluß auf das T-Zellrepertoire ausübt. Es wurde jedoch nicht gezeigt ob das in der Peripherie exprimierte Transgen auch funktionell ist, daß heißt, ob das kovalente MBP-Peptid genügend stark durch das transgene I-A<sup>u</sup> Molekül präsentiert wird, um antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren. Um dies zu zeigen wurden einerseits in vitro Versuche mit Milzzellen und Dendritischen Zellen und andererseits in vivo Versuche mit transferierten, CFSE-markierten TCR.Tg4-T-Zellen durchgeführt. Wie im folgenden dargestellt, konnte sowohl in vitro als auch in vivo die Aktivierung von TCR.Tg4-Zellen gezeigt werden.

### In vitro Aktivierung durch Milzzellen

Die Experimente mit Milzzellen von AMK<sub>35</sub>-Tieren zeigten, daß Zellen der transgenen Tiere ohne Zugabe von exogenem Peptid TCR.Tg4-T-Zellen aktivieren können (Abb. 31a). Milzzellen von Tieren auf dem Invariante Kette-knockout (li-ko) Hintergrund präsentierten das Peptid deutlich besser als Zellen auf dem Invariante Kette wildtyp (li-wt)-Hintergrund. Während in AMK<sub>35</sub> x li-wt nur eine sehr schwache Aktivierung von TCR.Tg4-Zellen zu beobachten war, wurden diese von Milzzellen aus AMK<sub>35</sub> x li-ko deutlich aktiviert. Mit Antikörpern gegen I-A<sup>u</sup> ist auf Milzzellen von AMK<sub>35</sub> x li-ko nur eine sehr schwache Expression des Transgenes zu sehen (nicht gezeigt). Daß heißt, daß zwar die Oberflächenexpression des transgenen Peptid-MHC-Konstruktes teilweise von der Invarianten Kette abhängig ist, es jedoch in Zellen ohne die Invariante Kette zu einem geringeren Austausch des kovalent gebundenen Peptides kommt und dies trotz der geringeren Oberflächenexpression zu einer erhöhten Antigendichte und damit zu einer verstärkten Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen führt. Dies stimmt mit Daten von Ignatowicz et al. überein, die in dem I-A<sup>b</sup>-E $\alpha$ -Konstrukt auf li-ko-Hintergrund trotz geringerer Oberflächenexpression eine bessere Aktivierung von einem dafür spezifischem T-Zell-Hybridom fanden als auf dem li-wt-Hintergrund (Ignatowicz et al., 1996a).

Im Gegensatz zu Daten von ähnlichen Konstrukten mit stabil bindenden Peptiden (Fukui et al., 1997) war die Aktivierung von TCR.Tg4 T-Zellen mit AMK<sub>35</sub>-Milzzellen, in vitro, nur mit unbestrahlten APC's möglich (Abb. 31a). Praktisch alle Antigenpräsentationsversuche werden mit bestrahlten APC's durchgeführt. In der Literatur gibt es jedoch ein Beispiel, welches

zeigt, daß die radioaktive Bestrahlung einen negativen Einfluß auf die Antigenpräsentation ausüben kann: In Experimenten mit Thymus-APC's zeigte sich, daß nur unbestrahlte Thymuszellen endogene MBP-Peptide präsentierten. Die RT-PCR zeigte, daß 24h nach Bestrahlung keine MBP-mRNA mehr vorhanden war (Fritz und Zhao, 1996). Dies heißt, daß die radioaktive Bestrahlung mit der Transkription oder der mRNA-Stabilität interferiert. Durch schwach bindende Peptide kann sich die Halbwertszeit des MHC-Peptid-Komplexes drastisch verkürzen. Stabil bindende Peptide können Komplexe mit einer Halbwertszeit von mehreren Tagen bilden, während diese bei schwach bindenden Komplexen auf Minuten begrenzt sein kann (Harrington et al., 1998). Daher ist möglicherweise gerade in dem hier verwendeten System mit einem schwach bindendem Peptid eine kontinuierliche Expression des Transgenes nötig um die Aktivierung der TCR.Tg4 Zellen zu erreichen.

Um zu testen in wie weit sich das kovalent gebundene Peptid durch exogenes Peptid verdrängen läßt, wurde das stabil bindende Ac1-10 (4Y) zu den Proliferationsexperimenten zugegeben (Abb. 31b). Transgene Milzzellen von AMK<sub>35</sub> auf li-wt und li-ko Hintergrund präsentierten das exogene Peptid. Die Präsentation von exogenem Peptid auf li-wt Hintergrund ist gut damit zu vereinbaren, daß durch die Invariante Kette das kovalente Peptid vom transgenen MHC-Molekül verdrängt wird und es daher leicht mit exogenem Peptid beladen werden kann. Die Beladung mit exogenem Peptid auf li-ko Hintergrund steht jedoch im Gegensatz zu Daten anderer transgener Peptid-MHC-Mauslinien (I-A<sup>b</sup>-E $\alpha$ ), in denen eine exogene Beladung des transgenen MHC-Moleküls nur auf li-wt Hintergrund möglich ist und auch mit sehr hohen Peptidkonzentrationen keine Aktivierung von zwei unterschiedlichen Hybridomen erreicht wurde (Fukui et al., 1997; Ignatowicz et al., 1996a). Dies ist mit der niedrigen Affinität von MBP1-10 (4K) in AMK<sub>35</sub> zu erklären, das sich wahrscheinlich von dem hochaffinen Ac1-10(4Y) leicht verdrängen läßt im Gegensatz zu dem an I-A<sup>b</sup> stabil bindendem E $\alpha$ -Peptid.

#### In vitro Aktivierung durch Dendritische Zellen

Da die Aktivierung von TCR.Tg4 Zellen durch Milzzellen von AMK<sub>35</sub> x li-ko Tieren zwar deutlich, jedoch wesentlich schwächer als die Aktivierung durch Zugabe exogenen Peptides war, wurden Dendritische Zellen als professionelle APC's in Proliferationsversuchen eingesetzt. Dafür wurde aus Knochenmark transgener Mäuse in vitro Dendritische Zellen (BM-DC's) gewonnen und mit LPS aktiviert. LPS-aktivierte Dendritische Zellen der Linie AMK<sub>35</sub> auf li-ko und li-wt Hintergrund zeigten eine sehr starke Aktivierung von TCR.Tg4-Zellen (Abb. 32). Hier konnten jedoch auch unbestrahlte APC's verwendet werden. Dies kann wahrscheinlich mit der sehr hohen MHC II-Expression auf aktivierten DC's erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die MHC II-Moleküle auf aktivierten DC's eine stabilere Konformation haben und weniger ausgetauscht werden (Kukutsch et al., 2000).

Die Aktivierung durch DC's ohne exogenes Peptid auf li-ko und li-wt Hintergrund war etwa gleich stark. Dies könnte damit erklärbar sein, daß die erhöhte Peptidbeladung in li-ko Zellen durch die höhere Expression der Transgene auf der Zelloberfläche auf li-wt Hintergrund ausgeglichen wird. Das widerspricht jedoch den Aktivierungsdaten mit Milz, in denen Zellen auf li-ko Hintergrund eindeutig besser stimulieren. Da die Aktivierung mit Milzzellen wahrscheinlich hauptsächlich auf Präsentation durch B-Zellen beruht, könnte dies auch Unterschiede der zwei Zelltypen (B-Zellen und Dendritische Zellen) bei der Antigenpräsentation von MHC

II widerspiegeln. So exprimieren Dendritische Zellen von li-ko Mäusen das MHC II Molekül I-A<sup>k</sup> nach Aktivierung als kompakte, mit Peptid beladene Form auf der Zelloberfläche (Rovere et al., 1998), während in aktivierten B-Zellen von li-ko Tieren nur ein kleiner Teil von I-A<sup>k</sup> als instabile, unbeladene Form auf die Zelloberfläche gelangt (Viville et al., 1993). Das zeigt, daß Dendritische Zellen einen li-unabhängigen Weg zur Peptidbeladung von MHC II haben. Dies könnte in Dendritischen Zellen von AMK<sub>35</sub> auf li-wt Hintergrund zu einem geringeren Austausch des kovalent gebundenen Peptides in führen als in B-Zellen auf li-wt-Hintergrund.

#### In vivo Aktivierung transferierter TCR.Tg4 Zellen

Um zu testen, ob MBP-spezifische TCR.Tg4-T-Zellen auch in vivo durch das transgene Peptid-MHC-Konstrukt aktiviert werden, wurden aufgereinigte TCR.Tg4 T-Zellen mit dem Lebendfarbstoff CFSE markiert und adoptiv in transgene Empfänger transferiert (Abb. 33). Zweiundvierzig Stunden nach Transfer wurden Lymphknoten und Milz der Empfängertiere auf die Proliferation der injizierten Zellen untersucht. Die transgenen Peptid-MHC-Konstrukte in den Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> führten in vivo zur Aktivierung und Proliferation der transferierten CD4<sup>+</sup>T-Zellen.

In AMK<sub>35</sub> Tieren auf li-ko Hintergrund war die Aktivierung wahrscheinlich so stark, daß die meisten transferierten Zellen durch Apoptose starben (Critchfield et al., 1994). Auch in den Mäusen mit li-wt Hintergrund war ein Teil der Zellen wahrscheinlich durch Apoptose gestorben: In nichttransgenen Tieren wurden etwa dreimal mehr CFSE-positive Zellen gefunden als in transgenen, in denen durch die Proliferation eigentlich eine Expansion der transferierten Zellen hätte stattfinden sollen.

Wie in Abb. 34 zu sehen ist, sind nicht nur transferierte CD4-, sondern auch CD8-Zellen in AMK<sub>35</sub> x li-ko reduziert. Obwohl in TCR.Tg4-Mäusen auch alle CD8-Zellen den transgenen TCR exprimieren, ist dies ungewöhnlich, da CD8-Zellen nicht den zur Aktivierung benötigten MHC II-spezifischen Korezeptor CD4 exprimieren. Zudem proliferieren die CD8-Zellen in AMK<sub>35</sub> x li-wt Tieren nicht. Für andere TCR-transgene Modelle wurde jedoch eine Korezeptor unabhängige Aktivierung gezeigt: CD8-Zellen mit einem transgenen TCR, der spezifisch für MHC II-Hämagglutinin (HA<sub>110-120</sub>) ist, lysierten andere Zielzellen peptidabhängig und MHC II-restringiert (Bot et al., 1998). Arbeiten mit CD4-ko Mäusen zeigten, daß CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup> T-Helfer Zellen generiert wurden (Mak et al., 1992; Wallace et al., 1992), und diese Zellen noch antigenspezifische, MHC II-restringierte Aktivität hatten (Rahemtulla et al., 1994). Außerdem konnte in manchen dieser Mäuse auf PL/J-Hintergrund EAE erzeugt, und in vitro MBP-spezifische Reaktivität gezeigt werden (Koh et al., 1994). Dies zeigt, daß der Korezeptor unter bestimmten Umständen nicht zur Aktivierung der T-Zellen notwendig ist. Daher führt wahrscheinlich die starke Antigendichte in AMK<sub>35</sub> x li-ko zur Deletion der CD8<sup>+</sup>TCR.Tg4-Zellen.

Das Transgen war in den Tieren, aus denen die BM-DC's gewonnen wurden und in welche die CFSE-markierten Zellen transferiert wurden, auf einem H-2<sup>u</sup>-negativen Hintergrund. Sowohl in den Versuchen mit den BM-DC's, als auch in den in vivo-Transfers wurden die TCR.Tg4 Zellen von MHC II-positiven Zellen depletiert. Die Interaktion des TCR von TCR.Tg4 Zellen mußte daher mit dem Peptid auf dem transgenem I-A<sup>u</sup> Molekül stattfinden.

Dies zeigt, daß die Transgene komplett und nicht als Abbruchprodukt und korrekt gefaltet auf der Zelloberfläche exprimiert wurden.

*Die Daten aus den Experimenten in vitro und in vivo zeigen, daß die Transgene in den Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> in der Peripherie exprimiert werden und zur Aktivierung und Proliferation antigenspezifischer T-Zellen führen. Die Toleranzinduktion in der Peripherie ist bereits bei extrem niedrigen Antigenkonzentrationen sehr effizient (Ferber et al., 1994). Daher sollte die Transgenexpression, trotz der restringierten MHC II-Expression in der Plazenta und im Fötus, die TCR.Tg4 T-Zellen in der Mutter beeinflussen können.*

## 6.6 Schwangerschaftsexperimente

### Das Transgen wird in der Plazenta und vom Fötus exprimiert

Vor den Schwangerschaftsexperimenten wurde getestet, ob die Transgene im Fötus und der Plazenta exprimiert werden. Dazu wurden transgen-negative Weibchen mit einem homozygoten AMK<sub>35</sub>-Männchen verpaart und Föten sowie Plazenta am Tag 14 der Schwangerschaft auf die Expression des Transgens analysiert (Abb. 35). Die RT-PCR zeigte, daß die Transgene in AMK<sub>35</sub> sowohl im Fötus, als auch in der Plazenta am Tag 14 der Schwangerschaft exprimiert werden. Natali et al zeigten, daß MHC Klasse II im Fötus der Maus am Tag 15 der Schwangerschaft im Thymus von DC's, in der Milz von vereinzelt Zellen, sowie von Endothelzellen der Darmkapillaren exprimiert wird (Natali et al., 1981). Die meisten fötalen B-Zellen sind bis kurz nach der Geburt MHC II negativ (Lam und Stall, 1994). Makrophagen werden in der fötalen Leber und in der Plazenta gefunden (Chang et al., 1993; Chatterjee-Hasrouni und Lala, 1982). In der Plazenta wird MHC II außerdem von Endothelzellen der Chorion-Villi exprimiert (Natali et al., 1981). Trophoblasten exprimieren kein MHC II (Chatterjee-Hasrouni und Lala, 1981). Die MHC II Expression ist abhängig von dem Transaktivator CIITA. CIITA wird entweder konstitutiv exprimiert, wie in B-Zellen oder DC's, oder wird über IFN- $\gamma$  induziert. In Trophoblasten wird CIITA weder konstitutiv, noch nach IFN- $\gamma$  Behandlung exprimiert (Murphy und Tomasi, 1998).

Trotz dieser eingeschränkten MHC II-Expression in der Plazenta und im Fötus wurde in der RT-PCR ein eindeutiges Signal sowohl für endogenes MHC II, als auch für das transgene MHC II gefunden. Dies zeigt, daß das Transgen vom fötalem Gewebe so exprimiert wird, daß es prinzipiell das maternale Immunsystem beeinflussen kann.

### EAE ist in TCR.Tg4 Tieren auf dem li-ko Hintergrund sehr variabel und stark verzögert

Peptide, die kovalent an MHC-Moleküle gebunden sind, werden in Tieren auf li-ko Hintergrund weniger durch andere Peptide ersetzt (Ignatowicz et al., 1996a). Die in vitro Versuche mit Milzzellen und die in vivo-Transfer Versuche zeigten, daß auch das hier verwendete Peptid besser auf li-ko Hintergrund präsentiert wird. Daher wurden auch TCR.Tg4 Mäuse auf den li-ko Hintergrund gekreuzt. Da bisher nicht bekannt war, ob in solchen Mäusen überhaupt EAE induziert werden konnte, wurde ein Vorversuch mit TCR.Tg4 x li-ko Tieren durchgeführt (Abb. 37). Der Versuch in Abb. 37, sowie einige kleinere Versuche, zeigten, daß der EAE-Verlauf extrem variabel und meist stark verzögert in Tieren auf li-ko Hinter-

grund ist. Der variable Verlauf ist möglicherweise mit dem genetischen Hintergrund der Tiere erklärbar. TCR.Tg4 haben den B10.PL Hintergrund, während die zur Verpaarung verwendeten li-ko Tiere auf dem C57BL/6-Hintergrund waren. Für den EAE-Versuch wurden zwar nur Tiere genommen, die Homozygot für I-A<sup>u</sup> waren, jedoch können auch nicht-MHC Gene eine wichtige Rolle bei dem Verlauf von EAE einnehmen (Maron et al., 1999; Montgomery und Rauch, 1982). li-ko Tiere haben weniger CD4-positive Zellen und exprimieren nur etwa 1/3 der MHC II Moleküle von Tieren auf li-wt Hintergrund (eigene Daten mit TCR.Tg4-Mäusen). Sowohl in der Phase der T-Zellaktivierung durch das Peptid in CFA, als auch in der Etablierungs- und Effektorphase im ZNS könnte die fehlende li-Expression inhibitorisch auf den EAE-Verlauf wirken. Insbesondere die Präsentation der endogenen MBP-Peptide von Gliazellen und Astrozyten im ZNS sollte abhängig von der Invarianten Kette sein. Die Invariante Kette leitet die MHC II-Moleküle über ein Sortierungssignal in endosomale/lysosomale Kompartimente, wo die Beladung mit Peptiden von Proteinen exogenen Ursprungs wie z.B. MBP erfolgt. Daher ist in li-ko Tieren die Präsentation von Peptiden aus extrazellulären Proteinen sehr ineffizient (Viville et al., 1993).

Da der EAE-Verlauf in den Tieren auf li-ko-Hintergrund so variabel und verzögert ist, konnten diese Tiere nicht in den Schwangerschaftsversuchen eingesetzt werden.

#### Die Schwangerschaft verzögert den Beginn von EAE

In Vorexperimenten wurde getestet, ob EAE in der frühen Schwangerschaft induzierbar ist. Die Vaginalpfropf (VP)-positiven Tiere wurden am Tag 4 post Koitus entweder mit CFA und MBP Ac1-10 und Pertussistoxin (PT) oder als Kontrolle nur mit CFA und PT behandelt (Tabelle 6). Da nur zwei der Vaginalpfropf-positiven Weibchen nach Behandlung nachweislich schwanger blieben, ist davon auszugehen, daß die frühe Behandlung mit CFA und/oder PT zum frühen Abort führte. In der Tat wurde gezeigt, daß gerade in der frühen Phase die Behandlung mit kleinsten Mengen LPS zum Abort führen (Gendron et al., 1990). Für Ratten und Kaninchen wurde gezeigt, daß die EAE-Induktion in der Schwangerschaft in vielen Tieren zum Abort führt. Insbesondere in Ratten führte nur die EAE-Induktion in der ersten Hälfte der Schwangerschaft zum Abort (Brenner et al., 1991).

Zwei der Tiere, in denen EAE am Tag 4 post Koitus induziert wurde, wurden trotz der EAE-Induktion schwanger (Abb. 36). Eines mußte getötet werden und eines erholte sich noch während der Schwangerschaft und hatte einen Wurf zum normalen Zeitpunkt von dem jedoch drei Tiere tot waren. Die Kinetik des EAE-Verlaufs war vergleichbar zu nicht schwangeren Tieren. Das heißt, daß der EAE-Verlauf nach Induktion in der frühen Schwangerschaft nicht stark supprimiert wird und prinzipiell die EAE-Induktion in der Schwangerschaft möglich ist. Dies war wichtig zu zeigen, da in Kaninchen EAE nicht während der Schwangerschaft auftritt (Brenner et al., 1991), und für die EAE-Induktion in schwangeren Mäuse keine Daten zur Verfügung standen.

In den folgenden Schwangerschaftsexperimenten mit den transgenen Linien wurde EAE am Tag 8,5 der Schwangerschaft induziert, da dies nur bei wenigen Tieren zum Abort führte, und der EAE-Beginn dadurch noch während, oder kurz nach der Schwangerschaft stattfinden sollte. Sowohl in Verpaarungen von B10.PL (Abb. 38), als auch in Verpaarungen von TCR.Tg4-Weibchen (Abb. 40) verzögerte die Schwangerschaft den Beginn von EAE um ca.



5-7 Tage. Der Ausbruch erfolgte meist einige Tage nach der Geburt oder dem Abort. Nur wenige Tiere, insbesondere TCR.Tg4-Weibchen, die mit DBA/2-Männchen verpaart wurden, bekamen EAE bereits einige Tage vor der Geburt. Insbesondere die Verzögerung von EAE, induziert in der späteren Schwangerschaft, und die nach der Geburt folgende Exazerbation ist den transienten Remissionen während der Schwangerschaft, die bei MS auftreten, sehr ähnlich. Die hier gefundene Verzögerung von EAE in der Schwangerschaft bestätigt Daten, die mit Meerschweinchen, Ratten (Keith, 1978) und Kaninchen (Evron et al., 1984) gewonnen wurden. Auch in diesen Versuchen entwickelte sich EAE erst nach der Geburt oder dem Abort.

#### *Weibchen, die mit DBA/2-Männchen verpaart wurden, entwickeln stärker EAE*

Sowohl in den Verpaarungen von B10.PL, als auch von TCR.Tg4 Weibchen entwickelten die Weibchen, die mit DBA/2-Männchen verpaart wurden, stärkere EAE, als die Weibchen, die mit den AMK<sub>35</sub>-Männchen verpaart wurden (Abb. 38 und 39). Insbesondere bei Verpaarungen von TCR.Tg4 mit DBA/2-Männchen starben alle Weibchen vor oder ganz kurz nach der Geburt. Das Experiment in Abb. 40 zeigte jedoch, daß dieser Effekt nicht auf das Fehlen des Transgens in DBA/2 zurückzuführen war, da die Weibchen, die mit transgen-negativen Geschwistertieren verpaart wurden, nicht stärker EAE hatten, als solche die mit AMK<sub>35</sub> oder AMK<sub>39</sub> verpaart wurden. Die Verpaarung von CBA-Weibchen mit DBA/2-Männchen führt zum spontanen Abort von ca. 25-50% der Föten um den Tag 12 der Schwangerschaft (Chaouat, 1993). Es wurde gezeigt, daß in dieser Verpaarungskombination eine defekte plazentale IL-10-Produktion vorliegt (Chaouat et al., 1995). In den hier durchgeführten Verpaarungen mit DBA/2-Männchen wurde anhand der Gewichtsmessung kein verstärkter Abort festgestellt. Wenn nur einige Föten einer Schwangerschaft resorbiert werden, könnten solche Aborte jedoch auch unauffällig sein, und nicht durch die Gewichtsmessung erfaßbar sein. Da bei einem Abort in Mäusen bis einige Tage vor der Geburt die Föten im Uterus resorbiert werden, ist ein Abort von wenigen Föten äußerlich nicht sichtbar. Nach einem vollständigem Abort tritt EAE schneller auf. Eventuell bewirkt ein teilweiser Abort auch einen beschleunigten EAE-Verlauf. Daher könnte die stärkere EAE in Verpaarungen mit DBA/2-Männchen durch einen verstärkten Abort in diesen Tieren erklärbar sein. Eine andere Möglichkeit ist, daß in den Verpaarungen mit DBA/2-Männchen eine niedrigere IL-10 Konzentration in der Plazenta vorlag. Da IL-10 die Induktion von EAE inhibieren kann (Bettelli et al., 1998; Rott et al., 1994) könnte dies zu einer schnelleren und stärkeren EAE in und nach der Schwangerschaft führen. Dies würde bedeuten, daß die paternal vererbten Gene des Fötus einen direkten Einfluß auf den Verlauf einer Autoimmunerkrankung in der Mutter ausüben können.

#### *Der Einfluß der Transgenexpression im Fötus auf den EAE-Verlauf in der Mutter*

Um den Einfluß des transgenen Peptid-MHC-Konstruktes im Fötus auf die EAE-Induktion in der Mutter zu testen, wurden B10.PL- oder TCR.Tg4-Weibchen mit transgenen Männchen der unterschiedlichen Linien verpaart und EAE am Tag 8,5 der Schwangerschaft induziert. In Verpaarungen mit AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> konnte jedoch kein inhibitorischer Einfluß auf die Induktion von EAE in der Mutter am Tag 8,5 der Schwangerschaft festgestellt werden (Abb. 38

und 40). Der EAE-Verlauf war in Verpaarungen mit transgen-negativen um 2 Tage verfrüht (Abb. 40). Dies war jedoch auf die zwei Aborte in dieser Gruppe zurückzuführen.

Mögliche Gründe dafür könnten sein: 1. Die Präsentation von Autoantigenen durch fötale Zellen im Komplex mit MHC II hat keinen Einfluß auf die Induktion von Autoimmunität; 2. MHC II und damit das Transgen ist in zu wenigen fötalen Zellen oder zu niedrig exprimiert, um die Autoimmunität in der Mutter zu beeinflussen; 3. Der Einfluß des Transgens findet nur während der Schwangerschaft statt und nicht mehr nach der Geburt, und wird daher durch die endogene Suppression in der normalen Schwangerschaft überdeckt. Solche endogenen Mechanismen der Suppression könnten die Sekretion suppressiver Faktoren, oder aber auch die endogene Expression und Präsentation von MBP-Peptiden durch den Fötus sein. 4. Da die CFA-Peptid-Emulsion an der Injektionsstelle über mehrere Wochen erhalten bleibt, findet eventuell durch die aktive EAE-Induktion mit Peptid in CFA eine kontinuierliche Stimulation bis über die Geburt hinaus statt. Dies könnte dazu führen, daß mögliche antigenspezifische Toleranzmechanismen in der Schwangerschaft entweder unterdrückt werden, oder kurz nach der Schwangerschaft verloren gehen. In TCR-transgenen Tieren auf Rag-wt Hintergrund wird spontane EAE durch regulatorische CD4<sup>+</sup>T-Zellen verhindert (Olivares-Villagomez et al., 1998; Van de Keere und Tonegawa, 1998). Trotzdem kann in solchen Tieren EAE durch aktive Induktion mit Peptid in CFA und PT induziert werden. Dies zeigt, daß bestimmte Mechanismen zur Toleranzerhaltung relativ leicht gebrochen werden können.

In Verpaarungen mit AMY<sub>04</sub> war der EAE-Verlauf leicht verzögert. Das mittlere Maximum dieser Gruppe war erniedrigt im Vergleich zu Verpaarungen mit Transgen-negativen. Dies könnte auf einen möglichen antigenspezifischen, suppressiven Mechanismus in Verpaarungen mit AMY<sub>04</sub>-Männchen hinweisen. Dieser könnte entweder durch das stabil bindende Peptid auf Zellen fötalen Ursprungs hervorgerufen werden, oder auf den Transfer des Autoantigens in das maternale Lymphsystem beruhen.

*In den bisher durchgeführten Experimenten konnte trotz fötaler Expression kein starker Einfluß der Transgene von AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> auf die Induktion von EAE in der Mutter während der Schwangerschaft festgestellt werden. In zukünftigen Versuchen mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen soll dies jedoch weiter untersucht werden. Das Transgen in AMY<sub>04</sub> hatte nur einen leicht abschwächenden Effekt auf die Stärke von EAE in der Mutter. Insgesamt führt die Schwangerschaft zu einer Verzögerung von EAE. Dies wurde für Mäuse bisher nicht gezeigt.*

## 6.7 Mögliche zukünftige Schwangerschaftsexperimente mit den transgenen Linien

Die Verpaarung mit AMY<sub>04</sub>-Männchen hatte einen leicht inhibitorischen Einfluß auf die EAE-Induktion in der Mutter. Um zu sehen ob die gefundene Suppression bestätigt werden kann, sollte dieser Versuch mit einer größeren Anzahl von Tieren wiederholt werden.

Die TCR.Tg4 x li-ko Tiere sollten weiter auf B10.PL zurückgekreuzt werden. Falls diese einen homogenen EAE-Verlauf zeigen, sollten sie auch in Schwangerschaftsversuchen mit AMK<sub>35</sub> auf li-ko-Hintergrund eingesetzt werden.

Da die aktive EAE-Induktion früh in der Schwangerschaft wahrscheinlich zum Abort führt, und spät in der Schwangerschaft supprimiert wird, sollte versucht werden, EAE passiv mit aktivierten TCR.Tg4-Zellen zu induzieren. Diese passive Induktion geht meist sehr schnell innerhalb von 5-7 Tagen. Ein Vorteil wäre, daß durch die passive Induktion keine weitere Stimulation über die Schwangerschaft hinaus stattfindet, wie mit der kontinuierlich anwesenden CFA-Peptid Emulsion. Eventuell könnte mit aktivierten T-Zellen auch früher in der Schwangerschaft ohne Abort EAE induziert werden. Da aktivierte T-Zellen normalerweise nicht durch Anergie tolerisiert werden können, wäre die Toleranzinduktion in solchen Experimenten wahrscheinlich auf periphere Deletion zurückzuführen. Eine solche Form der Toleranz würde sich jedoch von der durch Tafuri et al. charakterisierten reversiblen Toleranzinduktion in der Schwangerschaft unterscheiden (Tafuri et al., 1995).

Eine weitere, bisher nicht getestete Möglichkeit, wäre die EAE-Induktion vor der Schwangerschaft. Allerdings führte zumindest in Kaninchen die EAE-Induktion auch vor der Schwangerschaft in ca. 60% der Tiere zum Abort (Brenner et al., 1991).

Eine weitere Möglichkeit den Einfluß fötal exprimierter Antigene auf die Induktion von Autoimmunität in der Mutter zu untersuchen, wäre den Versuchsansatz umzudrehen und zu untersuchen, ob Föten, die kein MBP exprimieren können, nicht mehr zur beobachteten Verzögerung des EAE-Verlaufes in der Mutter führen (siehe Abb. 40). Dazu müßten Zygoten aus Shiverer-Mäusen (natürliche Mutante, die kein MBP exprimiert) in scheinschwangere TCR.Tg4-Weibchen transferiert werden. Da diese Weibchen selber MBP exprimieren, könnte EAE während der Schwangerschaft mit einem MBP-negativen Fötus induziert werden. Um wiederum den Einfluß der Transgene zu testen müßten AMK<sub>35</sub>-Tiere auf den Shiverer-Hintergrund gekreuzt werden und Zygoten dieser Tiere transferiert werden.

## **7. Zusammenfassung**

Ein Fötus exprimiert während der Schwangerschaft paternale Antigene, die für die Mutter fremd sind. Er kann daher als semi-allogenes Transplantat betrachtet werden. Mehrere Mechanismen der immunologischen Toleranz gegenüber dem Fötus wurden beschrieben. Unter anderem induziert der Fötus eine spezifische, systemische Toleranz in der Mutter gegenüber paternalen Antigenen des Fötus. Diese Toleranz ist jedoch transient und endet kurz nach der Geburt (Tafari et al., 1995).

Während der Schwangerschaft kommt es beim Menschen und in Tiermodellen häufig zu Remissionen in T-Zell basierten Autoimmunkrankheiten. Einige Tage bis Wochen nach der Geburt folgen jedoch meist starke Exazerbationen. Dies ist dem Phänomen der transienten Toleranz gegenüber paternalen Antigenen sehr ähnlich. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, daß die Expression der Autoantigene durch den Fötus zu den beobachteten Remissionen beiträgt.

In dieser Doktorarbeit sollte ein transgenes Mausmodell entwickelt werden, mit dem diese Hypothese geprüft werden kann. Als Autoimmunkrankheit wurde EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) ausgewählt, welches ein Tiermodell für Multiple Sklerose darstellt. Es wurden transgene Mäuse entwickelt, die das Autoantigen, mit dem EAE in bestimmten Mausstämmen induziert wird, dominant im Komplex mit MHC Klasse II präsentieren. Es wurden drei transgene Mausstämme etabliert. In zwei Mausstämmen AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> ist das Autoantigen MBP1-10 (Myelin Basic Protein) kovalent an die  $\beta$ -Kette des MHC Klasse II Moleküls I-A<sup>u</sup> gebunden. In einer anderen Linie AMY<sub>04</sub> ist das analoge Peptid MBP1-10 (4Y), mit höherer Affinität zum I-A<sup>u</sup> –Molekül, als lösliches, nicht an I-A<sup>u</sup> gebundenes Peptid exprimiert. Die Transgene unter der Kontrolle eines MHC Klasse II Promotors wurden sowohl von fötalen Zellen, als auch im adulten Tier MHC Klasse II-spezifisch exprimiert. Die Expression der Transgene führte zur Toleranz gegenüber dem Autoantigen in vitro. Je nach Mauslinie wurden sowohl Tiere mit einem normalen T-Zellrepertoire, als auch Tiere, die einen transgenen T-Zell Rezeptor exprimieren (TCR.Tg4), weitgehend tolerant gegen die Induktion von EAE. Die funktionelle Expression der Transgene in der Peripherie wurde in vitro und in vivo durch die Aktivierung von Autoantigen-spezifischen T-Zellen gezeigt.

In ersten Schwangerschaftsexperimenten wurde getestet, ob die fötale Expression dieser Transgene einen Einfluß auf die Induktion von EAE in der Schwangerschaft hat. Dazu wurden transgene Männchen mit B10.PL- oder TCR.Tg4-Weibchen verpaart, und in den schwangeren Weibchen EAE induziert. Die Schwangerschaft selbst mit nichttransgenen Föten führte zu einer Verzögerung des EAE-Beginns. EAE brach erst nach der Geburt oder dem Abort aus. Obwohl die Transgene in Plazenta und im Fötus exprimiert wurden, konnte

in Verpaarungen mit den Linien AMK<sub>35</sub> und AMK<sub>39</sub> kein Einfluß auf den Verlauf der Autoimmunkrankheit festgestellt werden. In Verpaarungen mit der Linie AMY<sub>04</sub> wurde eine leichte Abschwächung von EAE beobachtet.

Die Expression des Autoantigens durch den Fötus hatte demnach, in den hier durchgeführten Experimenten, keinen dominanten, inhibitorischen Einfluß auf die Induktion von EAE in der Mutter. Das transgene System hat sich jedoch als einsetzbar erwiesen und soll daher zur abschließenden Beantwortung der Fragestellung in künftigen Schwangerschaftsversuchen mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen verwendet werden.

## **8. Literaturverzeichnis**

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. (2000) *Cellular and molecular Immunology*. W.B. Saunders Company.
- Abramsky, O. (1994) Pregnancy and multiple sclerosis. *Ann Neurol*, **36**, S38-41.
- Abramsky, O., Brenner, T., Mizrahi, R. and Soffer, D. (1982) Alpha-fetoprotein suppresses experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, **2**, 1-7.
- Ait-Azzouzene, D., Gendron, M.C., Houdayer, M., Langkopf, A., Burki, K., Nemazee, D. and Kanellopoulos-Langevin, C. (1998) Maternal B lymphocytes specific for paternal histocompatibility antigens are partially deleted during pregnancy. *J Immunol*, **161**, 2677-83.
- Alam, S.M. and Gascoigne, N.R. (1998) Posttranslational regulation of TCR Valpha allelic exclusion during T cell differentiation. *J Immunol*, **160**, 3883-90.
- Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hammerling, G.J. and Arnold, B. (1998) Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science*, **282**, 1338-41.
- Allan, D.S., Colonna, M., Lanier, L.L., Churakova, T.D., Abrams, J.S., Ellis, S.A., McMichael, A.J. and Braud, V.M. (1999) Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med*, **189**, 1149-56.
- Allcock, R.J., Martin, A.M. and Price, P. (2000) The mouse as a model for the effects of MHC genes on human disease. *Immunol Today*, **21**, 328-32.
- Allison, J., Georgiou, H.M., Strasser, A. and Vaux, D.L. (1997) Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3943-7.
- Anderson, G., Hare, K.J. and Jenkinson, E.J. (1999) Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol Today*, **20**, 463-8.
- Anderson, G., Owen, J.J., Moore, N.C. and Jenkinson, E.J. (1994) Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J Exp Med*, **179**, 2027-31.
- Arbizu-Urdiain, T. and Martinez-Yelamos, A. (2000) [Axonal damage in multiple sclerosis]. *Rev Neurol*, **30**, 1223-7.
- Arndt, S.O., Vogt, A.B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wolpl, A., Sun, Y., Schandendorf, D., Hammerling, G.J. and Kropshofer, H. (2000) Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *Embo J*, **19**, 1241-51.
- Arnold, B., Horstmann, U., Kuon, W., Burgert, H.G., Hammerling, G.J. and Kvist, S. (1985) Alloreactive cytolytic T-cell clones preferentially recognize conformational determinants on histocompatibility antigens: analysis with genetically engineered hybrid antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7030-4.
- Arnold, B., Schonrich, G. and Hammerling, G.J. (1993) Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol Today*, **14**, 12-4.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, **18**, 767-811.
- Baron, J.L., Madri, J.A., Ruddle, N.H., Hashim, G. and Janeway, C.A., Jr. (1993) Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med*, **177**, 57-68.
- Bauer, J., Ruuls, S.R., Huitinga, I. and Dijkstra, C.D. (1996) The role of macrophage subpopulations in autoimmune disease of the central nervous system. *Histochem J*, **28**, 83-97.
- Beer, A.E. and Billingham, R.E. (1973) Maternally acquired runt disease. *Science*, **179**, 240-3.
- Beer, A.E. and Billingham, R.E. (1974) Host responses to intra-uterine tissue, cellular and fetal allografts. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **21**, 59-88.

- Bell, S.C. and Billington, W.D. (1980) Major anti-paternal alloantibody induced by murine pregnancy is non- complement-fixing IgG1. *Nature*, **288**, 387-8.
- Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A. and Duke, R.C. (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*, **377**, 630-2.
- Benoist, C. and Mathis, D. (1990) Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol*, **8**, 681-715.
- Benoist, C.O., Mathis, D.J., Kanter, M.R., Williams, V.E.d. and McDevitt, H.O. (1983) Regions of allelic hypervariability in the murine A alpha immune response gene. *Cell*, **34**, 169-77.
- Bettelli, E., Das, M.P., Howard, E.D., Weiner, H.L., Sobel, R.A. and Kuchroo, V.K. (1998) IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol*, **161**, 3299-306.
- Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., Cortese, I., Kondo, T., Afshar, G., Gran, B., Eaton, J., Antel, J., Frank, J.A., McFarland, H.F. and Martin, R. (2000) Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med*, **6**, 1167-75.
- Billingham, R.E. and Medawar, P.B. (1953) Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, **172**, 603-606.
- Birk, K., Smeltzer, S.C. and Rudick, R. (1988) Pregnancy and multiple sclerosis. *Semin Neurol*, **8**, 205-13.
- Bluthmann, H., Kieselow, P., Uematsu, Y., Malissen, M., Krimpenfort, P., Berns, A., von Boehmer, H. and Steinmetz, M. (1988) T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes. *Nature*, **334**, 156-9.
- Bonney, E.A. and Matzinger, P. (1997) The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells. *J Immunol*, **158**, 40-7.
- Boshart, M., Kluppel, M., Schmidt, A., Schutz, G. and Luckow, B. (1992) Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene*, **110**, 129-30.
- Bot, A., Casares, S., Bot, S., von Boehmer, H. and Bona, C. (1998) Cellular mechanisms involved in protection against influenza virus infection in transgenic mice expressing a TCR receptor specific for class II hemagglutinin peptide in CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, **160**, 4500-7.
- Brabb, T., Goldrath, A.W., von Dassow, P., Paez, A., Liggitt, H.D. and Goverman, J. (1997) Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J Immunol*, **159**, 497-507.
- Brabb, T., von Dassow, P., Ordonez, N., Schnabel, B., Duke, B. and Goverman, J. (2000) In situ tolerance within the central nervous system As a mechanism for preventing autoimmunity [In Process Citation]. *J Exp Med*, **192**, 871-80.
- Braud, V., Jones, E.Y. and McMichael, A. (1997) The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol*, **27**, 1164-9.
- Braud, V.M., Allan, D.S. and McMichael, A.J. (1999) Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol*, **11**, 100-8.
- Braunstein, N.S. and Germain, R.N. (1987) Allele-specific control of Ia molecule surface expression and conformation: implications for a general model of Ia structure-function relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 2921-5.
- Brenner, T., Evron, S. and Abramsky, O. (1991) Effect of experimental autoimmune encephalomyelitis on pregnancy: studies in rabbits and rats. *Isr J Med Sci*, **27**, 181-5.
- Bretscher, P. and Cohn, M. (1970) A theory of self-nonsel self discrimination. *Science*, **169**, 1042-9.
- Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E. and Palmiter, R.D. (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 836-40.

- Brocker, T., Riedinger, M. and Karjalainen, K. (1997) Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med*, **185**, 541-50.
- Burkhardt, C., Liu, G.Y., Anderton, S.M., Metzler, B. and Wraith, D.C. (1999) Peptide-induced T cell regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for IL-10. *Int Immunol*, **11**, 1625-34.
- Burnet, F. (1959) The clonal selection theory of acquired immunity. *Cambridge University Press, London*.
- Butcher, E.C. and Picker, L.J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, **272**, 60-6.
- Buzas, E.I., Hollo, K., Rubliczky, L., Garzo, M., Nyirkos, P. and Glant, T.T. (1993) Effect of pregnancy on proteoglycan-induced progressive polyarthritis in BALB/c mice: remission of disease activity. *Clin Exp Immunol*, **94**, 252-60.
- Campbell, J.J. and Butcher, E.C. (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*, **12**, 336-41.
- Campbell, J.J., Pan, J. and Butcher, E.C. (1999) Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol*, **163**, 2353-7.
- Carstens, C., Newman, D.K., Bohlen, H., Konig, A. and Koch, N. (2000) Invariant chains with the class II binding site replaced by a sequence from influenza virus matrix protein constrain low-affinity sequences to MHC II presentation. *Int Immunol*, **12**, 1561-8.
- Chang, M.D., Pollard, J.W., Khalili, H., Goyert, S.M. and Diamond, B. (1993) Mouse placental macrophages have a decreased ability to present antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 462-6.
- Chaouat, G. (1993) *Immunology of pregnancy*.
- Chaouat, G., Assal Meliani, A., Martal, J., Raghupathy, R., Elliot, J., Mosmann, T. and Wegmann, T.G. (1995) IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- $\tau$ . *J Immunol*, **154**, 4261-8.
- Chaouat, G., Cayol, V., Mairovitz, V. and Dubanchet, S. (1999) Localization of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the fetomaternal interface during human and murine pregnancy and lack of requirement for Fas/Fas ligand interaction for a successful allogeneic pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, **42**, 1-13.
- Chaouat, G., Menu, E., Clark, D.A., Dy, M., Minkowski, M. and Wegmann, T.G. (1990) Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil*, **89**, 447-58.
- Chatterjee-Hasrouni, S. and Lala, P.K. (1981) MHC antigens on mouse trophoblast cells: paucity of Ia antigens despite the presence of H-2K and D. *J Immunol*, **127**, 2070-3.
- Chatterjee-Hasrouni, S. and Lala, P.K. (1982) Localization of paternal H-2K antigens on murine trophoblast cells in vivo. *J Exp Med*, **155**, 1679-89.
- Chen, Y., Inobe, J., Kuchroo, V.K., Baron, J.L., Janeway, C.A. and Weiner, H.L. (1996) Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 388-91.
- Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A. and Weiner, H.L. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, **265**, 1237-40.
- Clark, D.A., Slapsys, R.M., Croy, B.A. and Rossant, J. (1984) Immunoregulation of host-versus graft responses in the uterus. *Immunology Today*, **5**, 111-115.
- Cobbold, S. and Waldmann, H. (1998) Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol*, **10**, 518-24.
- Cobbold, S.P., Jayasuriya, A., Nash, A., Prospero, T.D. and Waldmann, H. (1984) Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature*, **312**, 548-51.
- Coffman, R.L. (1982) Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol Rev*, **69**, 5-23.



- Coligan, J.E. (1994) *Current protocols in immunology*. J. Wiley & Sons, [New York].
- Corr, M., Slanetz, A.E., Boyd, L.F., Jelonek, M.T., Khilko, S., al-Ramadi, B.K., Kim, Y.S., Maher, S.E., Bothwell, A.L. and Margulies, D.H. (1994) T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity [see comments]. *Science*, **265**, 946-9.
- Cresswell, P. (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol*, **12**, 259-93.
- Cresswell, P. (1996) Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*, **84**, 505-7.
- Critchfield, J.M., Racke, M.K., Zuniga-Pflucker, J.C., Cannella, B., Raine, C.S., Gorman, J. and Lenardo, M.J. (1994) T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, **263**, 1139-43.
- Cross, J.C., Werb, Z. and Fisher, S.J. (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, **266**, 1508-18.
- Curnow, S.J. and Schmitt-Verhulst, A.M. (1994) The balance between deletion and activation of CD4+8+ thymocytes is controlled by T cell receptor-antigen interactions and is affected by cyclosporin A. *Eur J Immunol*, **24**, 2401-9.
- Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition [published erratum appears in *Nature* 1988 Oct 20;335(6192):744]. *Nature*, **334**, 395-402.
- Demotz, S., Grey, H.M. and Sette, A. (1990) The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science*, **249**, 1028-30.
- Denzin, L.K., Sant'Angelo, D.B., Hammond, C., Surman, M.J. and Cresswell, P. (1997) Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science*, **278**, 106-9.
- Dialynas, D.P., Wilde, D.B., Marrack, P., Pierres, A., Wall, K.A., Havran, W., Otten, G., Loken, M.R., Pierres, M., Kappler, J. and et al. (1983) Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. *Immunol Rev*, **74**, 29-56.
- Evron, S., Brenner, T. and Abramsky, O. (1984) Suppressive effect of pregnancy on the development of experimental allergic encephalomyelitis in rabbits. *Am J Reprod Immunol*, **5**, 109-13.
- Fairchild, P.J., Wildgoose, R., Atherton, E., Webb, S. and Wraith, D.C. (1993) An autoantigenic T cell epitope forms unstable complexes with class II MHC: a novel route for escape from tolerance induction. *Int Immunol*, **5**, 1151-8.
- Ferber, I., Schonrich, G., Schenkel, J., Mellor, A.L., Hammerling, G.J. and Arnold, B. (1994) Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science*, **263**, 674-6.
- Floyd, R.C. and Roberts, W.E. (1992) Autoimmune diseases in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*, **19**, 719-32.
- Fremont, D.H., Monnaie, D., Nelson, C.A., Hendrickson, W.A. and Unanue, E.R. (1998) Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity*, **8**, 305-17.
- Freund, J., Lipton, M. and Tompson, E.G. (1953) Aspermatogenesis in the guinea pig induced by testicular tissue and adjuvants. *J Exp Med*, **97**, 711.
- Fritz, R.B. and Kalvakolanu, I. (1995) Thymic expression of the golli-myelin basic protein gene in the SJL/J mouse. *J Neuroimmunol*, **57**, 93-9.
- Fritz, R.B. and Zhao, M.L. (1996) Thymic expression of myelin basic protein (MBP). Activation of MBP-specific T cells by thymic cells in the absence of exogenous MBP. *J Immunol*, **157**, 5249-53.
- Fukui, Y., Ishimoto, T., Utsuyama, M., Gytoku, T., Koga, T., Nakao, K., Hirokawa, K., Katsuki, M. and Sasazuki, T. (1997) Positive and negative CD4+ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus. *Immunity*, **6**, 401-10.
- Gabor, M.J., Godfrey, D.I. and Scollay, R. (1997) Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes. *Eur J Immunol*, **27**, 2010-5.

- Gallatin, W.M., Weissman, I.L. and Butcher, E.C. (1983) A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, **304**, 30-4.
- Gendron, R.L., Nestel, F.P., Lapp, W.S. and Baines, M.G. (1990) Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. *J Reprod Fertil*, **90**, 395-402.
- Germain, R.N., Bentley, D.M. and Quill, H. (1985) Influence of allelic polymorphism on the assembly and surface expression of class II MHC (Ia) molecules. *Cell*, **43**, 233-42.
- Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L.P., Hood, L. and Zaller, D.M. (1993) Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*, **72**, 551-60.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation [see comments]. *Science*, **285**, 221-7.
- Gray, L.S., Huber, K.S., Gray, M.C., Hewlett, E.L. and Engelhard, V.H. (1989) Pertussis toxin effects on T lymphocytes are mediated through CD3 and not by pertussis toxin catalyzed modification of a G protein. *J Immunol*, **142**, 1631-8.
- Gregoire, C., Rebai, N., Schweisguth, F., Necker, A., Mazza, G., Auphan, N., Millward, A., Schmitt-Verhulst, A.M. and Malissen, B. (1991) Engineered secreted T-cell receptor alpha beta heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8077-81.
- Griffith, T.S., Yu, X., Herndon, J.M., Green, D.R. and Ferguson, T.A. (1996) CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity*, **5**, 7-16.
- Grogan, J.L., Kramer, A., Nogai, A., Dong, L., Ohde, M., Schneider-Mergener, J. and Kamradt, T. (1999) Cross-reactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice. *J Immunol*, **163**, 3764-70.
- Gross, D.M., Forsthuber, T., Tary-Lehmann, M., Etling, C., Ito, K., Nagy, Z.A., Field, J.A., Steere, A.C. and Huber, B.T. (1998) Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. *Science*, **281**, 703-6.
- Gruender, S., Meyerhoff, J. and Flavell, R. (1994) The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity*, **1**, 155-66.
- Gunning, P., Leavitt, J., Muscat, G., Ng, S.Y. and Kedes, L. (1987) A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 4831-5.
- Hammerling, G.J., Rusch, E., Tada, N., Kimura, S. and Hammerling, U. (1982) Localization of allo-determinants on H-2Kb antigens determined with monoclonal antibodies and H-2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 4737-41.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Hanahan, D. (1998) Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, **10**, 656-62.
- Harding, C.V. and Unanue, E.R. (1990) Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature*, **346**, 574-6.
- Harrington, C.J., Paez, A., Hunkapiller, T., Mannikko, V., Brabb, T., Ahearn, M., Beeson, C. and Goverman, J. (1998) Differential tolerance is induced in T cells recognizing distinct epitopes of myelin basic protein. *Immunity*, **8**, 571-80.
- Hasenkrug, K.J., Cory, J.M. and Stimpfling, J.H. (1987) Monoclonal antibodies defining mouse tissue antigens encoded by the H-2 region. *Immunogenetics*, **25**, 136-9.

- Hathcock, K.S., Laszlo, G., Dickler, H.B., Bradshaw, J., Linsley, P. and Hodes, R.J. (1993) Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation [see comments]. *Science*, **262**, 905-7.
- Hausmann, S. and Wucherpfennig, K.W. (1997) Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens. *Curr Opin Immunol*, **9**, 831-8.
- Heath, W.R. and Carbone, F.R. (1999) Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr Opin Immunol*, **11**, 314-8.
- Heath, W.R., Carbone, F.R., Bertolino, P., Kelly, J., Cose, S. and Miller, J.F. (1995) Expression of two T cell receptor alpha chains on the surface of normal murine T cells. *Eur J Immunol*, **25**, 1617-23.
- Hedley, M.L., Drake, B.L., Head, J.R., Tucker, P.W. and Forman, J. (1989) Differential expression of the class I MHC genes in the embryo and placenta during midgestational development in the mouse. *J Immunol*, **142**, 4046-53.
- Herzenberg, L.A., Bianchi, D.W., Schroder, J., Cann, H.M. and Iverson, G.M. (1979) Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1453-5.
- Hisahara, S., Yuan, J., Momoi, T., Okano, H. and Miura, M. (2001) Caspase-11 Mediates Oligodendrocyte Cell Death and Pathogenesis of Autoimmune-mediated Demyelination. *J Exp Med*, **193**, 111-122.
- Horwitz, M.S., Bradley, L.M., Harbertson, J., Krah, T., Lee, J. and Sarvetnick, N. (1998) Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med*, **4**, 781-5.
- Huang, A.Y., Bruce, A.T., Pardoll, D.M. and Levitsky, H.I. (1996) In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity*, **4**, 349-55.
- Huang, M.T. and Gorman, C.M. (1990) The simian virus 40 small-t intron, present in many common expression vectors, leads to aberrant splicing. *Mol Cell Biol*, **10**, 1805-10.
- Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P. and von Boehmer, H. (1991) Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell*, **66**, 533-40.
- Hunt, J.S., Vassmer, D., Ferguson, T.A. and Miller, L. (1997) Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol*, **158**, 4122-8.
- Ignatowicz, L., Kappler, J. and Marrack, P. (1996a) The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell*, **84**, 521-9.
- Ignatowicz, L., Kappler, J., Parker, D.C. and Marrack, P. (1996b) The responses of mature T cells are not necessarily antagonized by their positively selecting peptide. *J Immunol*, **157**, 1827-31.
- Ignatowicz, L., Winslow, G., Bill, J., Kappler, J. and Marrack, P. (1995) Cell surface expression of class II MHC proteins bound by a single peptide. *J Immunol*, **154**, 3852-62.
- Ito, K., Bian, H.J., Molina, M., Han, J., Magram, J., Saar, E., Belunis, C., Bolin, D.R., Arceo, R., Campbell, R., Falcioni, F., Vidovic, D., Hammer, J. and Nagy, Z.A. (1996) HLA-DR4-IE chimeric class II transgenic, murine class II-deficient mice are susceptible to experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med*, **183**, 2635-44.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. and Sakaguchi, S. (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*, **162**, 5317-26.
- Jacoby, D.R., Olding, L.B. and Oldstone, M.B. (1984) Immunologic regulation of fetal-maternal balance. *Adv Immunol*, **35**, 157-208.

- Jameson, S.C., Nakajima, P.B., Brooks, J.L., Heath, W., Kanagawa, O. and Gascoigne, N.R. (1991) The T cell receptor V alpha 11 gene family. Analysis of allelic sequence polymorphism and demonstration of J alpha region-dependent recognition by allele-specific antibodies. *J Immunol*, **147**, 3185-93.
- Janeway, C.A., Jr., Conrad, P.J., Lerner, E.A., Babich, J., Wettstein, P. and Murphy, D.B. (1984) Monoclonal antibodies specific for Ia glycoproteins raised by immunization with activated T cells: possible role of T cellbound Ia antigens as targets of immunoregulatory T cells. *J Immunol*, **132**, 662-7.
- Janeway, C.A., Jr. and Travers, P. (1997) *Immuno Biolgy The Immune System in Health And Disease*.
- Jansson, L., Olsson, T. and Holmdahl, R. (1994) Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol*, **53**, 203-7.
- Jiang, S.P. and Vacchio, M.S. (1998) Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft". *J Immunol*, **160**, 3086-90.
- Johnson, P.M., Vince, G.S. and Christmas, S.E. (1997) NK cells and reproduction. *Immunol Today*, **18**, 605-6.
- Kabat, E.A., Wolf, A. and Bezer, A.E. (1947) The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J Exp Med*, **85**, 117-130.
- Kamimura, S., Eguchi, K., Yonezawa, M. and Sekiba, K. (1991) Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med Okayama*, **45**, 135-9.
- Kamradt, T., Soloway, P.D., Perkins, D.L. and Geffer, M.L. (1991) Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *J Immunol*, **147**, 3296-302.
- Kang, S.M., Schneider, D.B., Lin, Z., Hanahan, D., Dichek, D.A., Stock, P.G. and Baekkeskov, S. (1997) Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med*, **3**, 738-43.
- Kappler, J.W., Roehm, N. and Marrack, P. (1987) T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, **49**, 273-80.
- Kappler, J.W., Skidmore, B., White, J. and Marrack, P. (1981) Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J Exp Med*, **153**, 1198-214.
- Kappos, L., Comi, G., Panitch, H., Oger, J., Antel, J., Conlon, P., Steinman, L., Rae-Grant, A., Castaldo, J., Eckert, N., Guarnaccia, J.B., Mills, P., Johnson, G., Calabresi, P.A., Pozzilli, C., Bastianello, S., Giugni, E., Witjas, T., Cozzone, P., Pelletier, J., Pohlau, D. and Przuntek, H. (2000) Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. *Nat Med*, **6**, 1176-82.
- Kawamura, K., Fukuda, J., Itoh, H., Ito, K., Kodama, H., Kumagai, J., Kumagai, A. and Tanaka, T. (2000) Chaperonin 10 in the rat oocytes and early embryos: its expression and activity for early pregnancy factor. *Am J Reprod Immunol*, **44**, 242-8.
- Keith, A.B. (1978) Effect of pregnancy on experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs and rats. *J Neurol Sci*, **38**, 317-26.
- Kim, S., Liva, S.M., Dalal, M.A., Verity, M.A. and Voskuhl, R.R. (1999) Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *Neurology*, **52**, 1230-8.

- King, A., Boocock, C., Sharkey, A.M., Gardner, L., Beretta, A., Siccardi, A.G. and Loke, Y.W. (1996) Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol*, **156**, 2068-76.
- King, A., Loke, Y.W. and Chaouat, G. (1997) NK cells and reproduction. *Immunol Today*, **18**, 64-6.
- Kirberg, J., Berns, A. and von Boehmer, H. (1997) Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med*, **186**, 1269-75.
- Klein, L., Klein, T., Ruther, U. and Kyewski, B. (1998) CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J Exp Med*, **188**, 5-16.
- Klein, L., Klugmann, M., Nave, K.A., Tuohy, V.K. and Kyewski, B. (2000) Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells [see comments]. *Nat Med*, **6**, 56-61.
- Koh, D.R., Ho, A., Rahemtulla, A., Penninger, J. and Mak, T.W. (1994) Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice lacking CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, **24**, 2250-3.
- Kohn, F.R., Grigg, M.E. and Klingemann, H.G. (1991) Differential regulation of fibronectin receptor subunit gene and cell surface expression in human peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol*, **146**, 1484-9.
- Korn-Lubetzki, I., Kahana, E., Cooper, G. and Abramsky, O. (1984) Activity of multiple sclerosis during pregnancy and puerperium. *Ann Neurol*, **16**, 229-31.
- Kouskoff, V., Fehling, H.J., Lemeur, M., Benoist, C. and Mathis, D. (1993) A vector driving the expression of foreign cDNAs in the MHC class II- positive cells of transgenic mice. *J Immunol Methods*, **166**, 287-91.
- Kranz, D.M. (2000) Incompatible differences: view of an allogeneic pMHC-TCR complex. *Nature Immunology*, **1**, 277-278.
- Krause, I., Blank, M. and Shoenfeld, Y. (2000) Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance. *Crit Rev Immunol*, **20**, 1-16.
- Krishnan, L., Guilbert, L.J., Russell, A.S., Wegmann, T.G., Mosmann, T.R. and Belosevic, M. (1996a) Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to Leishmania major infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol*, **156**, 644-52.
- Krishnan, L., Guilbert, L.J., Wegmann, T.G., Belosevic, M. and Mosmann, T.R. (1996b) T helper 1 response against Leishmania major in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells. *J Immunol*, **156**, 653-62.
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Thery, C., Armandola, E.A., Li, B.C., Moldenhauer, G., Amigorena, S. and Hammerling, G.J. (1998) A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *Embo J*, **17**, 2971-81.
- Ksander, B.R. and Streilein, J.W. (1994) Regulation of the immune response within privileged sites. *Chem Immunol*, **58**, 117-45.
- Kukutsch, N.A., Rossner, S., Austyn, J.M., Schuler, G. and Lutz, M.B. (2000) Formation and kinetics of MHC class I-ovalbumin peptide complexes on immature and mature murine dendritic cells. *J Invest Dermatol*, **115**, 449-53.
- Kumar, V. and Sercarz, E.E. (1993) The involvement of T cell receptor peptide-specific regulatory CD4+ T cells in recovery from antigen-induced autoimmune disease. *J Exp Med*, **178**, 909-16.
- Kumar, V., Stellrecht, K. and Sercarz, E. (1996) Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Exp Med*, **184**, 1609-17.

- Kyewski, B.A., Fathman, C.G. and Kaplan, H.S. (1984) Intrathymic presentation of circulating non-major histocompatibility complex antigens. *Nature*, **308**, 196-9.
- Lafaille, J.J., Keere, F.V., Hsu, A.L., Baron, J.L., Haas, W., Raine, C.S. and Tonegawa, S. (1997) Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med*, **186**, 307-12.
- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M. and Tonegawa, S. (1994) High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*, **78**, 399-408.
- Lam, K.P. and Stall, A.M. (1994) Major histocompatibility complex class II expression distinguishes two distinct B cell developmental pathways during ontogeny. *J Exp Med*, **180**, 507-16.
- Lanier, L.L. (1998) Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell*, **92**, 705-7.
- Lanoue, A., Bona, C., von Boehmer, H. and Sarukhan, A. (1997) Conditions that induce tolerance in mature CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*, **185**, 405-14.
- Le Meur, M., Waltzinger, C., Gerlinger, P., Benoist, C. and Mathis, D. (1989) Restricted assembly of MHC class II molecules in transgenic mice. *J Immunol*, **142**, 323-7.
- Ledbetter, J.A. and Herzenberg, L.A. (1979) Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol Rev*, **47**, 63-90.
- Lee, C., Liang, M.N., Tate, K.M., Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Jones, P.P. and McConnell, H.M. (1998) Evidence that the autoimmune antigen myelin basic protein (MBP) Ac1-9 binds towards one end of the major histocompatibility complex (MHC) cleft. *J Exp Med*, **187**, 1505-16.
- Lehmann, P.V., Forsthuber, T., Miller, A. and Sercarz, E.E. (1992) Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*, **358**, 155-7.
- Lemke, H., Hammerling, G.J. and Hammerling, U. (1979) Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice. *Immunol Rev*, **47**, 175-206.
- Lenschow, D.J., Zeng, Y., Thistlethwaite, J.R., Montag, A., Brady, W., Gibson, M.G., Linsley, P.S. and Bluestone, J.A. (1992) Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig [see comments]. *Science*, **257**, 789-92.
- Liblau, R.S., Singer, S.M. and McDevitt, H.O. (1995) Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases [see comments]. *Immunol Today*, **16**, 34-8.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B. and Knolle, P.A. (2000) Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8<sup>+</sup> T cells results in antigen-specific T-cell tolerance [In Process Citation]. *Nat Med*, **6**, 1348-54.
- Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schonrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B. and Hammerling, G.J. (1998) Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol*, **28**, 2395-406.
- Lin, H., Mosmann, T.R., Guilbert, L., Tuntipopipat, S. and Wegmann, T.G. (1993) Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol*, **151**, 4562-73.
- Linthicum, D.S., Munoz, J.J. and Blaskett, A. (1982) Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol*, **73**, 299-310.
- Liu, G.Y., Fairchild, P.J., Smith, R.M., Prowle, J.R., Kioussis, D. and Wraith, D.C. (1995) Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity*, **3**, 407-15.
- Liu, G.Y. and Wraith, D.C. (1995) Affinity for class II MHC determines the extent to which soluble peptides tolerize autoreactive T cells in naive and primed adult mice-- implications for autoimmunity. *Int Immunol*, **7**, 1255-63.

- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. and Schuler, G. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, **223**, 77-92.
- Lyons, D.S., Lieberman, S.A., Hampl, J., Boniface, J.J., Chien, Y., Berg, L.J. and Davis, M.M. (1996) A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity*, **5**, 53-61.
- Mackay, C.R. (1991) T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. *Immunol Today*, **12**, 189-92.
- Madsen, L.S., Andersson, E.C., Jansson, L., krogsgaard, M., Andersen, C.B., Engberg, J., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Hjorth, J.P., Holmdahl, R., Wucherpfennig, K.W. and Fugger, L. (1999) A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T- cell receptor. *Nat Genet*, **23**, 343-7.
- Mak, T.W., Rahemtulla, A., Schilham, M., Koh, D.R. and Fung-Leung, W.P. (1992) Generation of mutant mice lacking surface expression of CD4 or CD8 by gene targeting. *J Autoimmun*, **5 Suppl A**, 55-9.
- Malek, T.R., Robb, R.J. and Shevach, E.M. (1983) Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukin 2 receptor-ligand complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 5694-8.
- Maron, R., Hancock, W.W., Slavin, A., Hattori, M., Kuchroo, V. and Weiner, H.L. (1999) Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol*, **11**, 1573-80.
- Martin, J., Wei, B.Y. and David, C.S. (1993) Expression of MHC class II A alpha k transgene. Pairing with endogenous beta-chain is dependent upon affinity and competition. *Transplantation*, **56**, 1233-6.
- Marusic, S. and Tonegawa, S. (1997) Tolerance induction and autoimmune encephalomyelitis amelioration after administration of myelin basic protein-derived peptide. *J Exp Med*, **186**, 507-15.
- Matsumoto, K., Yoshikai, Y., Moroi, Y., Asano, T., Ando, T. and Nomoto, K. (1991) Two differential pathways from double-negative to double-positive thymocytes. *Immunology*, **72**, 20-6.
- Mattsson, R., Mattsson, A., Holmdahl, R., Whyte, A. and Rook, G.A. (1991) Maintained pregnancy levels of oestrogen afford complete protection from post-partum exacerbation of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol*, **85**, 41-7.
- McGargill, M.A., Derbinski, J.M. and Hogquist, K. (2000) Receptor editing in developing T cells. *Nature Immunology*, **1**, 336-341.
- McMahan, C.J. and Fink, P.J. (1998) RAG reexpression and DNA recombination at T cell receptor loci in peripheral CD4+ T cells. *Immunity*, **9**, 637-47.
- Mellor, A.L., Sivakumar, J., Chandler, P., Smith, K., Molina, H., Mao, D. and Munn, D.H. (2001) Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nature Immunology*, **2**, 64-68.
- Merck. (1993) *MSD-MANUAL der Diagnostik und Therapie*. Urban und Schwarzenberg.
- Meselson, M. and Yuan, R. (1968) DNA restriction enzyme from E. coli. *Nature*, **217**, 1110-4.
- Metlay, J.P., Witmer-Pack, M.D., Agger, R., Crowley, M.T., Lawless, D. and Steinman, R.M. (1990) The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med*, **171**, 1753-71.
- Metzler, B. and Wraith, D.C. (1993) Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhalation but not oral administration of the encephalitogenic peptide: influence of MHC binding affinity. *Int Immunol*, **5**, 1159-65.

- Miller, S.D., Vanderlugt, C.L., Begolka, W.S., Pao, W., Yauch, R.L., Neville, K.L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A. and Kim, B.S. (1997) Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med*, **3**, 1133-6.
- Montgomery, I.N. and Rauch, H.C. (1982) Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice: primary control of EAE susceptibility is outside the H-2 complex. *J Immunol*, **128**, 421-5.
- Morgan, I.M. (1946) Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey cord. *J. Bakteriol.*, **51**, 614-615.
- Moynier, M., Cosso, B., Brochier, J. and Clot, J. (1987) Identification of class II HLA alloantibodies in placenta-eluted gamma globulins used for treating rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **30**, 375-81.
- Mujtaba, M.G., Soos, J.M. and Johnson, H.M. (1997) CD4 T suppressor cells mediate interferon tau protection against experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, **75**, 35-42.
- Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A. and Mellor, A.L. (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*, **189**, 1363-72.
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C. and Mellor, A.L. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism [see comments]. *Science*, **281**, 1191-3.
- Murali-Krishna, K., Lau, L.L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J. and Ahmed, R. (1999) Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice [see comments]. *Science*, **286**, 1377-81.
- Murphy, S.P. and Tomasi, T.B. (1998) Absence of MHC class II antigen expression in trophoblast cells results from a lack of class II transactivator (CIITA) gene expression. *Mol Reprod Dev*, **51**, 1-12.
- Naquet, P., Naspetti, M. and Boyd, R. (1999) Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Semin Immunol*, **11**, 47-55.
- Natali, P.G., De Martino, C., Pellegrino, M.A. and Ferrone, S. (1981) Analysis of the expression of I-Ak-like antigens in murine fetal and adult tissues with the monoclonal antibody 10-2.16. *Scand J Immunol*, **13**, 541-6.
- Nelson, J.L., Hughes, K.A., Smith, A.G., Nisperos, B.B., Branchaud, A.M. and Hansen, J.A. (1992) Remission of rheumatoid arthritis during pregnancy and maternal-fetal class II alloantigen disparity. *Am J Reprod Immunol*, **28**, 226-7.
- Nelson, J.L., Hughes, K.A., Smith, A.G., Nisperos, B.B., Branchaud, A.M. and Hansen, J.A. (1993) Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, **329**, 466-71.
- Nikolic-Zugic, J. and Bevan, M.J. (1988) Thymocytes expressing CD8 differentiate into CD4+ cells following intrathymic injection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8633-7.
- Norbury, C.C., Chambers, B.J., Prescott, A.R., Ljunggren, H.G. and Watts, C. (1997) Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, **27**, 280-8.
- Noto, K., Kato, K., Okumura, K. and Yagita, H. (1995) Identification and functional characterization of mouse CD29 with a mAb. *Int Immunol*, **7**, 835-42.
- Ober, C., Aldrich, C., Rosinsky, B., Robertson, A., Walker, M.A., Willadsen, S., Verp, M.S., Geraghty, D.E. and Hunt, J.S. (1998) HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta*, **19**, 127-32.
- Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1991) Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*, **65**, 305-17.



- Oi, V.T., Jones, P.P., Goding, J.W. and Herzenberg, L.A. (1978) Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. *Curr Top Microbiol Immunol*, **81**, 115-20.
- Olivares-Villagomez, D., Wang, Y. and Lafaille, J.J. (1998) Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, **188**, 1883-94.
- Olivares-Villagomez, D., Wensky, A.K., Wang, Y. and Lafaille, J.J. (2000) Repertoire requirements of CD4+ T cells that prevent spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, **164**, 5499-507.
- Ozato, K., Mayer, N.M. and Sachs, D.H. (1982) Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. *Transplantation*, **34**, 113-20.
- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M. and Lanzavecchia, A. (1993) Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science*, **262**, 422-4.
- Page, D.M., Roberts, E.M., Peschon, J.J. and Hedrick, S.M. (1998) TNF receptor-deficient mice reveal striking differences between several models of thymocyte negative selection. *J Immunol*, **160**, 120-33.
- Pearson, C.I., van Ewijk, W. and McDevitt, H.O. (1997) Induction of apoptosis and T helper 2 (Th2) responses correlates with peptide affinity for the major histocompatibility complex in self-reactive T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*, **185**, 583-99.
- Penit, C., Lucas, B., Vasseur, F., Rieker, T. and Boyd, R.L. (1996) Thymic medulla epithelial cells acquire specific markers by post-mitotic maturation. *Dev Immunol*, **5**, 25-36.
- Perry, L.L., Barzaga-Gilbert, E. and Trotter, J.L. (1991) T cell sensitization to proteolipid protein in myelin basic protein-induced relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, **33**, 7-15.
- Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1989) Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature*, **342**, 559-61.
- Pircher, H., Rohrer, U.H., Moskophidis, D., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1991) Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature*, **351**, 482-5.
- Qin, S., Cobbold, S.P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J. and Waldmann, H. (1993) "Infectious" transplantation tolerance. *Science*, **259**, 974-7.
- Radu, C.G., Anderton, S.M., Firan, M., Wraith, D.C. and Ward, E.S. (2000) Detection of autoreactive T cells in H-2(u) mice using peptide-MHC multimers [In Process Citation]. *Int Immunol*, **12**, 1553-60.
- Raghupathy, R. (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*, **18**, 478-82.
- Rahemtulla, A., Kundig, T.M., Narendran, A., Bachmann, M.F., Julius, M., Paige, C.J., Ohashi, P.S., Zinkernagel, R.M. and Mak, T.W. (1994) Class II major histocompatibility complex-restricted T cell function in CD4-deficient mice. *Eur J Immunol*, **24**, 2213-8.
- Rammensee, H.G., Friede, T. and Stevanović, S. (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, **41**, 178-228.
- Razi-Wolf, Z., Freeman, G.J., Galvin, F., Benacerraf, B., Nadler, L. and Reiser, H. (1992) Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4210-4.
- Rellahan, B.L., Jones, L.A., Kruisbeek, A.M., Fry, A.M. and Matis, L.A. (1990) In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med*, **172**, 1091-100.
- Rivers, T.M., Sprunt, D.H. and Berry, G.P. (1933) Observations on attempts to produce acute encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med*, **58**, 39.

- Rogers, A.M., Boime, I., Connolly, J., Cook, J.R. and Russell, J.H. (1998) Maternal-fetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. *Eur J Immunol*, **28**, 3479-87.
- Romagnani, S. (1997) The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*, **18**, 263-6.
- Roth, I., Corry, D.B., Locksley, R.M., Abrams, J.S., Litton, M.J. and Fisher, S.J. (1996) Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med*, **184**, 539-48.
- Rott, O., Fleischer, B. and Cash, E. (1994) Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol*, **24**, 1434-40.
- Rovere, P., Zimmermann, V.S., Forquet, F., Demandolx, D., Trucy, J., Ricciardi-Castagnoli, P. and Davoust, J. (1998) Dendritic cell maturation and antigen presentation in the absence of invariant chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1067-72.
- Sakaguchi, S. (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, **101**, 455-8.
- Salojin, K.V., Zhang, J., Madrenas, J. and Delovitch, T.L. (1998) T-cell anergy and altered T-cell receptor signaling: effects on autoimmune disease. *Immunol Today*, **19**, 468-73.
- Samson, M.F. and Smilek, D.E. (1995) Reversal of acute experimental autoimmune encephalomyelitis and prevention of relapses by treatment with a myelin basic protein peptide analogue modified to form long-lived peptide-MHC complexes. *J Immunol*, **155**, 2737-46.
- Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hammerling, G.J. and Arnold, B. (1991) Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell*, **65**, 293-304.
- Schonrich, G., Momburg, F., Hammerling, G.J. and Arnold, B. (1992) Anergy induced by thymic medullary epithelium. *Eur J Immunol*, **22**, 1687-91.
- Schrocksadel, H., Baier-Bitterlich, G., Dapunt, O., Wachter, H. and Fuchs, D. (1996) Decreased plasma tryptophan in pregnancy. *Obstet Gynecol*, **88**, 47-50.
- Scott, B., Liblau, R., Degermann, S., Marconi, L.A., Ogata, L., Caton, A.J., McDevitt, H.O. and Lo, D. (1994) A role for non-MHC genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity. *Immunity*, **1**, 73-83.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F. and Ohashi, P.S. (1999) Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol*, **17**, 829-74.
- Seddon, B. and Mason, D. (1999a) Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J Exp Med*, **189**, 877-82.
- Seddon, B. and Mason, D. (1999b) Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med*, **189**, 279-88.
- Seddon, B. and Mason, D. (2000) The third function of the thymus. *Immunol Today*, **21**, 95-9.
- Shimizu, Y., Van Severen, G.A., Horgan, K.J. and Shaw, S. (1990) Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature*, **345**, 250-3.
- Shoenfeld, Y. and Isenberg, D. (1989) *The mosaic of autoimmunity*. Elsevier.
- Snell, G.D. (1948) Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genetics*, **49**, 87-108.
- Soos, J.M., Subramaniam, P.S., Hobeika, A.C., Schiffenbauer, J. and Johnson, H.M. (1995) The IFN pregnancy recognition hormone IFN-tau blocks both development and superantigen reactivation of experimental allergic encephalomyelitis without associated toxicity. *J Immunol*, **155**, 2747-53.

- Sprent, J., Boehmer, H.V. and Nabholz, M. (1975) Association of immunity and tolerance to host H-2 determinants in irradiated F1 hybrid mice reconstituted with bone marrow cells from one parental strain. *J Exp Med*, **142**, 321-31.
- Staerz, U.D., Rammensee, H.G., Benedetto, J.D. and Bevan, M.J. (1985) Characterization of a murine monoclonal antibody specific for an allotypic determinant on T cell antigen receptor. *J Immunol*, **134**, 3994-4000.
- Steinman, L. (1996) Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, **85**, 299-302.
- Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, **368**, 215-21.
- Stevens, D.B., Chen, K., Seitz, R.S., Sercarz, E.E. and Bronstein, J.M. (1999) Oligodendrocyte-specific protein peptides induce experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol*, **162**, 7501-9.
- Streilein, J.W. (1996) Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues. *Transplant Proc*, **28**, 2066-70.
- Stuart, G. and Krikorian, K.S. (1928) The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **22**, 327-377.
- Surh, C.D., Lee, D.S., Fung-Leung, W.P., Karlsson, L. and Sprent, J. (1997) Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4+ T cells. *Immunity*, **7**, 209-19.
- Suto, R. and Srivastava, P.K. (1995) A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein- chaperoned peptides. *Science*, **269**, 1585-8.
- Swanborg, R.H. (1995) Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol*, **77**, 4-13.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T.J. and Eisen, H.N. (1996) Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*, **4**, 565-71.
- Tafuri, A., Alferink, J., Moller, P., Hammerling, G.J. and Arnold, B. (1995) T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science*, **270**, 630-3.
- Tarlinton, D. (1993) Direct demonstration of MHC class II surface expression on murine pre-B cells. *Int Immunol*, **5**, 1629-35.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-81.
- Trowbridge, I.S., Lesley, J., Schulte, R., Hyman, R. and Trotter, J. (1982) Biochemical characterization and cellular distribution of a polymorphic, murine cell-surface glycoprotein expressed on lymphoid tissues. *Immunogenetics*, **15**, 299-312.
- Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A. and Kinkel, R.P. (1999) Spontaneous regression of primary autoreactivity during chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Exp Med*, **189**, 1033-42.
- Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Mathisen, P.M., Johnson, J.M. and Kawczak, J.A. (2000) Modulation of the IL-10/IL-12 cytokine circuit by interferon-beta inhibits the development of epitope spreading and disease progression in murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, **111**, 55-63.
- Unkeless, J.C. (1979) Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med*, **150**, 580-96.
- Urban, J.L., Horvath, S.J. and Hood, L. (1989) Autoimmune T cells: immune recognition of normal and variant peptide epitopes and peptide-based therapy. *Cell*, **59**, 257-71.
- Urban, R.G., Chicz, R.M., Vignali, D.A. and Strominger, J.L. (1993) The dichotomy of peptide presentation by class I and class II MHC proteins. *Chem Immunol*, **57**, 197-234.

- Utsunomiya, Y., Bill, J., Palmer, E., Gollob, K., Takagaki, Y. and Kanagawa, O. (1989) Analysis of a monoclonal rat antibody directed to the alpha-chain variable region (V alpha 3) of the mouse T cell antigen receptor. *J Immunol*, **143**, 2602-8.
- Valitutti, S. and Lanzavecchia, A. (1997) Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol Today*, **18**, 299-304.
- Van de Keere, F. and Tonegawa, S. (1998) CD4(+) T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*, **188**, 1875-82.
- van Meerwijk, J.P., Marguerat, S., Lees, R.K., Germain, R.N., Fowlkes, B.J. and MacDonald, H.R. (1997) Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med*, **185**, 377-83.
- Van Parijs, L. and Abbas, A.K. (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*, **280**, 243-8.
- Van Parijs, L., Biuckians, A. and Abbas, A.K. (1998) Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J Immunol*, **160**, 2065-71.
- Viola, A. and Lanzavecchia, A. (1996) T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds [see comments]. *Science*, **273**, 104-6.
- Viret, C., Wong, F.S. and Janeway, C.A., Jr. (1999) Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity*, **10**, 559-68.
- Viville, S., Neefjes, J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C. and Mathis, D. (1993) Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell*, **72**, 635-48.
- Voehringer, D., Blaser, C., Grawitz, A.B., Chisari, F.V., Buerki, K. and Pircher, H. (2000) Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol*, **165**, 2415-22.
- Vogt, A.B., Kropshofer, H. and Hammerling, G.J. (1997) How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules. *Hum Immunol*, **54**, 170-9.
- Volkman, A., Zal, T. and Stockinger, B. (1997) Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J Immunol*, **158**, 693-706.
- Vowles, C., Chan, V.S. and Bodmer, H.C. (2000) Subtle effects on myelin basic protein-specific T cell responses can lead to a major reduction in disease susceptibility in experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*, **165**, 75-82.
- Vyse, T.J. and Todd, J.A. (1996) Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*, **85**, 311-8.
- Wadsworth, S.A., Chang, A.C., Hong, M.J., Halvorson, M.J., Otto, S. and Coligan, J.E. (1995) Expression of a novel integrin beta 1 chain epitope and anti-beta 1 antibody-mediated enhancement of fibronectin binding are dependent on the stage of T cell differentiation. *J Immunol*, **154**, 2125-33.
- Waites, G.T. and Whyte, A. (1987) Effect of pregnancy on collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immunol*, **67**, 467-76.
- Wallace, V.A., Rahemtulla, A., Timms, E., Penninger, J. and Mak, T.W. (1992) CD4 expression is differentially required for deletion of MLS-1a-reactive T cells. *J Exp Med*, **176**, 1459-63.
- Weiner, H.L. (1997) Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today*, **18**, 335-43.
- Whitelaw, C.B., Archibald, A.L., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J.P. and Clark, A.J. (1991) Targeting expression to the mammary gland: intronic sequences can enhance the efficiency of gene expression in transgenic mice. *Transgenic Res*, **1**, 3-13.
- Wilder, R.L. (1995) Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*, **13**, 307-38.

- Wilder, R.L. (1998) Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, **840**, 45-50.
- Wilson, A., D'Amico, A., Ewing, T., Scollay, R. and Shortman, K. (1988) Subpopulations of early thymocytes. A cross-correlation flow cytometric analysis of adult mouse Ly-2-L3T4-(CD8-CD4-) thymocytes using eight different surface markers. *J Immunol*, **140**, 1461-9.
- Wood, G.W. (1994) Is restricted antigen presentation the explanation for fetal allograft survival? *Immunol Today*, **15**, 15-8.
- Wraith, D.C., Smilek, D.E., Mitchell, D.J., Steinman, L. and McDevitt, H.O. (1989) Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell*, **59**, 247-55.
- Wucherpfennig, K.W. and Strominger, J.L. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*, **80**, 695-705.
- Yamamoto, K., Fukui, Y., Esaki, Y., Inamitsu, T., Sudo, T., Yamane, K., Kamikawaji, N., Kimura, A. and Sasazuki, T. (1994) Functional interaction between human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) class II and mouse CD4 molecule in antigen recognition by T cells in HLA-DR and DQ transgenic mice [see comments]. *J Exp Med*, **180**, 165-71.
- Yamashita, I., Nagata, T., Tada, T. and Nakayama, T. (1993) CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol*, **5**, 1139-50.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-19.
- Yasuda, C.L., Al-Sabbagh, A., Oliveira, E.C., Diaz-Bardales, B.M., Garcia, A.A. and Santos, L.M. (1999) Interferon beta modulates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the pattern of cytokine secretion. *Immunol Invest*, **28**, 115-26.
- Yokoyama, W.M., Koning, F., Kehn, P.J., Pereira, G.M., Stingl, G., Coligan, J.E. and Shevach, E.M. (1988) Characterization of a cell surface-expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation. *J Immunol*, **141**, 369-76.
- Yoshimoto, T., Bendelac, A., Watson, C., Hu-Li, J. and Paul, W.E. (1995) Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science*, **270**, 1845-7.
- Yu, M., Johnson, J.M. and Tuohy, V.K. (1996) A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med*, **183**, 1777-88.
- Zal, T., Volkman, A. and Stockinger, B. (1994) Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med*, **180**, 2089-99.
- Zamvil, S.S. and Steinman, L. (1990) The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol*, **8**, 579-621.
- Zhang, B., Harness, J., Somdevilla-Torres, M.J., Hillyard, N.C., Mould, A.W., Alewood, D., Love, S.G., Alewood, P.F., Greer, J.M., Cavanagh, A.C., McCombe, P.A. and Morton, H. (2000) Early pregnancy factor suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis induced in lewis rats with myelin basic protein and in SJL/J mice with myelin proteolipid protein peptide 139-151. *J Neurol Sci*, **182**, 5-15.
- Zhao, Z.S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P.A. and Cantor, H. (1998) Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science*, **279**, 1344-7.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H. and Lenardo, M.J. (1995) Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature*, **377**, 348-51.

- Ziegler, S.F., Levin, S.D., Johnson, L., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Baker, E., Sutherland, G.R., Feldhaus, A.L. and Ramsdell, F. (1994) The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *J Immunol*, **152**, 1228-36.
- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, **248**, 701-2.

## 9. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle (Cell)
AS	Aminosäure
BM-DC's	engl.: <i>Bone Marrow derived Dendritic Cells</i>
bio	Biotin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
CIITA	MHC Klasse II Transkriptionsaktivator
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CFSE	5,6-Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidyl-Ester
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CLIP	Klasse II assoziiertes invariante Ketten-Peptid
CMV	enhancer / promotor - Region des humanen Cytomegalovirus (Transkriptionsinitiator / -regulator)
Cpm	Counts pro Minute
C-Terminus	Das Carboxy-Ende eines Proteins
CTL	Cytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DesTCR	Désiré-T-Zell-Rezeptor (erkennt MHC Klasse I Molekül K <sup>b</sup> )
dH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser (Millipore)
DM	HLA-DM (Mensch) oder H-2M (Maus)
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DO	HLA-DO (Mensch) oder H2-O (Maus)
DP	Doppelpositiv (CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> )
dpi	Tag nach Immunisierung (engl.: day post immunization)
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
Engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Etbr.	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS-Analyse	Fluorescence Activated Cell Sorting- Analyse (fluoreszenzaktivierte Zelltrennung sowie Analyse)
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

FSC	engl.: Forward Side scatter (entspricht in etwa der Größe)
G418	Neomycinderivat (Proteinsyntheseinhibitor)
h	Stunde(n)
H-2	Maus MHC Komplex
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariante Kette
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
K	Lysin
kd	Kilo-Dalton (Molekulargewicht)
ko	engl.: Knock Out
l	Liter
LCMV	Lymphozyto-Choriomeningitis Virus
L	Leucin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium, Wachstumsmedium für <i>E. coli</i>
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MBP	basisches Myelinprotein
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenz Intensität
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHC I	MHC Klasse I
MHC II	MHC Klasse II
min	Minute(n)
mRNA	Boten-(Messenger) RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
N-Terminus	Das Aminoende eines Proteins
Nt	Nukleotid
OD <sub>nm</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge nm



PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PT	Pertussistoxin
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	engl.: single positive (z.B. CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>-</sup> )
SSC	engl.: Sideward Side Scatter (entspricht in etwa der Granularität)
Std.	Stunde
TAP	engl.: Transporter associated with antigen processing
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TCR	T-Zell-(Cell) Rezeptor
U/l	Units pro Liter
ÜN	Über Nacht
V	Volt
VCAM	vaskuläres Adhäsionsmolekül
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin